

MODELLREAKTIONEN ZUR ENZYMKATALYSE

Kinetische und thermodynamische Studien zur inter- und intramolekular SH katalysierten Esterhydrolyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

Dorothee Petz geb. Fisch
aus Düsseldorf

Marburg/Lahn 1975

Druck: Mauersberger, Marburg

MODELLREAKTIONEN ZUR ENZYMKATALYSE

Kinetische und thermodynamische Studien zur inter- und intramolekular SH katalysierten Esterhydrolyse

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

Dorothee Petz geb. Fisch
aus Düsseldorf

Marburg/Lahn 1975

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Chemie der Philipps - Universität
Marburg/Lahn als Dissertation angenommen am: 10.12.75

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.75

Dekan:	Prof. Dr. G. Schmid
Berichterstatter:	Prof. Dr. Fr. Schneider
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. Follmann

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider am Physiologisch - Chemischen Institut II der Philipps-Universität Marburg/Lahn in der Zeit von Mai 1972 bis Juli 1975 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider danke ich für die Überlassung des Themas und die Förderung der vorliegenden Untersuchungen.

Frau L. Körner und Herrn Th. Stein danke ich für die fleißige und tatkräftige Unterstützung meiner präparativen Arbeit.

Herrn Dipl. Chem.W. Kördel und Herrn Dr. H.G. Löffler danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Ebenso danke ich Herrn Pfeiffer von der analytischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg/Lahn für die Durchführung der CHN - Analysen.

Herrn Käss danke ich für die Anfertigung eines großen Teils der Zeichnungen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I.	Einleitung.....	1
----	-----------------	---

II. Material und Methoden

1.	Material	
1.1.	Übersicht der synthetisierten Verbindungen.....	4
1.2.	Estersubstrate.....	6
1.3.	Puffersysteme.....	7
1.4.	Geräte.....	7

2. Methoden

2.1.	Messung der intermolekular kat. Esterhydrolyse....	8
2.2.	Messung der intramolekular kat. Esterhydrolyse....	9
2.3.	Kinetik der katalysierten NPA - Hydrolyse.....	10
2.4.	Bestimmung der pK - Werte.....	10
2.5.	Bestimmung des SH - Gehalts.....	13

3. Methoden zur Auswertung der Messungen

3.1.	Ermittlung von k_1	14
3.2.	Ermittlung von k_2 und k_2'	15
3.3.	Ermittlung von k_2 u. des pK-Werts nach Lindley....	16
3.4.	Brönsted-Katalyse-Gesetz.....	17
3.5.	Bestimmung der thermodynamischen Konstanten.....	18
3.6.	Auswertung der Kinetik.....	19

III. Ergebnisse

1. Ergebnisse der Messungen zur intermolekular katalysierten Esterhydrolyse

1.1.	pK - Werte der Verbindungen.....	20
1.2.	Kinetische Konstanten.....	21
1.3.	Ergebnisse der Kinetik.....	30
1.4.	Thermodynamische Konstanten.....	34

2.	Ergebnisse der Messungen zur intramolekular katalysierten Esterhydrolyse	
2.1.	pK - Werte der Verbindungen.....	35
2.2.	Kinetische Konstanten.....	36
2.3.	Thermodynamische Konstanten.....	37
IV.	Diskussion	
1.1.	Charakteristik der nukleophilen Katalyse.....	38
1.2.	Kooperative nukleophile Katalyse.....	41
2.	Diskussion der Ergebnisse	
2.1.	Thiol-, Carboxyl- und Imidazol katalysierte Hydrolyse von NPA.....	43
2.2.	Katalyse der Esterhydrolyse durch Zusammenwirken von Carboxyl- und Imidazolrest.....	45
2.3.	Katalyse der Esterhydrolyse durch Zusammenwirken von Carboxyl- und Thiolgruppe.....	48
2.4.	Katalyse der Esterhydrolyse durch Zusammenwirken von Imidazol und Thiolgruppe.....	55
2.5.	Katalyse der Esterhydrolyse durch Zusammenwirken von Imidazol, Thiol- und Carboxylgruppe.....	58
2.6.	Vergleich der Effektivität der durch Imidazol/COOH/OH und Imidazol/COOH/SH katalysierten NPA Hydrolyse.....	61
3.	Vergleich der spontanen und katalysierten NPA und Boc-AlaONp - Hydrolyse.....	62
4.	pH - Abhängigkeit der k_2 - Werte.....	64
5.	Diskussion der aus dem Lindley - Diagramm ermittelten pK-Werte	67
6.	Diskussion der thermodynamischen Größen.....	68
7.	Diskussion zur intramolekular katalysierten Esterhydrolyse.....	73
8.	Vergleich der Affinität der SH- und OH-Gruppe bei der intramol. katal. Esterhydrolyse.....	80

9.	Zusammenfassende Diskussion.....	82
V.	Präparativer Teil	
1.	Synthese der Peptide	
1.1.	Synthesepläne.....	86
1.2.	Beschreibung der Synthesen.....	93
2.	Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion zu den Synthesen.....	106
3.	Experimenteller Teil	
3.1.	Material und Methoden.....	114
3.2.	Literaturpräparate.....	117
3.3.	Arbeitsvorschriften.....	119
VI.	Zusammenfassung.....	150
VII.	Literaturverzeichnis.....	153

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Aminosäuren, Peptide und die jeweiligen Derivate werden nach den von der IUPAC - IUB - Kommission für biochemische Nomenklatur herausgegebenen Regeln abgekürzt [112,113,114].

Außerdem werden folgende Abkürzungen verwendet:

HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DC - Harnstoff	Dicyclohexylharnstoff
NPA	p-Nitrophenylacetat
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoes.)
Ac	Aceton
DMF	Dimethylformamid
HAc	Essigsäure
MeOH	Methanol
EtOH	Äthanol
PE	Petroläther
TÄA	Triäthylamin
THF	Tetrahydrofuran

I. Einleitung

Eine der zentralen Fragestellungen der Enzymologie ist nach wie vor die nach den Prinzipien der Enzymkatalyse. Trotz intensiver Bemühungen der verschiedensten naturwissenschaftlichen Disziplinen ist es bis heute nicht gelungen, diese Prinzipien in wenigen, allgemeingültigen Aussagen zu formulieren. Das hängt zum Teil mit der chemischen Natur der Enzyme zusammen, die sämtlich Proteine sind und damit zu den interessantesten Makromolekülen gehören, die die Natur überhaupt hervorgebracht hat. Mit dem zunehmenden Verständnis der physikalisch chemischen Eigenschaften der Proteine und der sich aus ihrem makromolekularen Charakter ergebenden Besonderheiten, schreitet auch unser Verständnis der katalytisch wirkenden Proteine, nämlich der Enzyme voran.

Vom Standpunkt des Enzymologen, der sich für den molekularen und nicht nur mathematisch verfolgbaren Mechanismus der Enzymkatalyse interessiert, ist die Frage der Reaktivität der unmittelbar an der Katalyse beteiligten funktionellen Gruppen und ihre Beeinflußbarkeit durch Nachbargruppeneffekte und Mikroumgebung von besonderem Interesse [1]. Wegen der Komplexität der enzymatischen Reaktionen, der Vielzahl der in den Proteinen vorhandenen funktionellen Gruppen und der Empfindlichkeit der Proteine gegenüber extremen Bedingungen ist das Studium der Eigenschaften des aktiven Zentrums und seiner reaktiven Gruppen direkt an den Enzymen sehr erschwert.

Hier können Modellreaktionen zur Enzymkatalyse weiterhelfen und uns in vielen Fällen Auskunft darüber geben, was chemisch möglich ist und auch an niedermolekularen multifunktionellen Verbindungen in einer intramolekularen oder intermolekularen Katalyse realisiert werden kann. Solche Modelluntersuchungen haben den Vorteil, daß sie übersichtlicher verlaufen als die meistens sehr komplexen enzymatischen Reaktionen und daß die Bedingungen, unter denen sie durchgeführt werden können, leichter manipulierbar sind als bei den empfindlichen Enzymen.

Unter den interessanten funktionellen Gruppen stehen die SH-, OH-, Carboxylgruppe und der Imidazolrest an erster Stelle, da diese Gruppen besonders häufig im aktiven Zentrum von Enzymen gefunden werden. Die katalytischen Eigenschaften dieser Gruppen sind in zahlreichen Arbeiten eingehend studiert worden [2,3,4,5]. Diese Arbeiten haben dem Enzymologen wertvolle Anregungen und Hilfen bei der Formulierung von Reaktionsmechanismen enzymkatalysierter Reaktionen gegeben. In letzter Zeit steht bei diesen Untersuchungen das Problem der Nachbargruppeneffekte stark im Vordergrund [6,7,8,9]. Dabei geht es um die Frage, wie die Reaktivität einer katalytisch aktiven Gruppe durch eine ideal benachbarte zweite funktionelle Gruppe, die selbst auch katalytisch aktiv sein kann, beeinflußt wird. Dieser Einfluß wird an der katalytischen Effektivität der Verbindung gemessen. Die katalysierte Reaktion kann sich dabei auch im selben Molekül abspielen dem die katalytisch aktive Gruppe angehört; wir haben es dann mit einer intramolekular katalysierten Reaktion zu tun [10]; dieser Fall ist vereinfachend mit der Umwandlung eines Enzym-Substrat-Komplexes in Enzym + Produkt vergleichbar.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Systeme gehören beiden Typen an: es werden sowohl intermolekular als auch intramolekular katalysierte Reaktionen studiert.

Die durchgeführten Untersuchungen zur potentiell multifunktionellen Katalyse von SH und Imidazolrest, SH- und Carboxylgruppe und SH-, Carboxylgruppe und Imidazolrest sind daher von besonderer Bedeutung. Weiterhin wurde noch der Einfluß einer Wechselwirkung zwischen Carboxylgruppe und Imidazolrest und SH- und Amidgruppe, der in den Enzymen am häufigsten vorkommenden funktionellen Gruppe, auf die Esterhydrolyse untersucht. Die zum Studium der multifunktionellen intermolekularen Katalyse synthetisierten Verbindungen sind ausschließlich Peptide, die Cystein, Histidin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure als trifunktionelle Aminosäuren enthalten, während Untersuchungen zur intramolekularen Katalyse auch an Verbindungen durchgeführt wurden, die aromatische Systeme enthalten und günstige Voraussetzungen für eine optimale Fixierung katalytisch aktiver

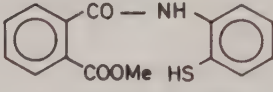
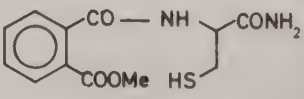
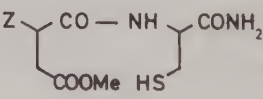
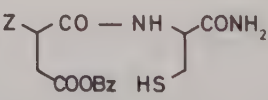
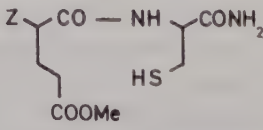
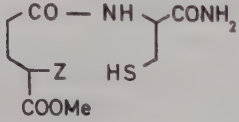
Gruppen gewährleisten. Die katalysierte Reaktion ist in allen Fällen eine Esterhydrolyse, wobei als Substrat p-Nitrophenylacetat und Boc-Ala-p-Nitrophenylester für die intermolekularen Reaktionen verwendet wird.

Durch die Wahl der funktionellen Gruppen ergibt sich ein direkter Bezug zur Enzymkatalyse, da für eine Reihe von Enzymen wie z.B. Streptococcal - Protease (EC 3.4.4.18) [11], Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1) [12], Kreatinkinase (EC 2.7.3.2) [13], β -Amylase (EC 3.2.1.2) [14] und β -Glucosidase (EC 3.2.1.23) [15] eine kooperative Imidazol/SH - Katalyse angenommen wird, bei einigen Enzymen vermutet man eine multifunktionelle Katalyse durch Zusammenwirken von SH- und Carboxylgruppe z.B. bei Ficin (EC 3.4.4.12) [16] und Bromelain (EC 3.4.4.c) [17]; bei Papain (EC 3.4.4.10) werden beide Möglichkeiten diskutiert [18,19,20].

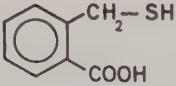
Die Arbeit gliedert sich der Themenstellung entsprechend in zwei Hauptteile: Einen präparativen Teil, der sich mit den Synthesen der untersuchten Katalysatoren und Modellverbindungen befaßt; ein erheblicher Teil der Experimente dient der Synthese von Peptiden nach klassischen Verfahren.

Im zweiten Teil der Arbeit geht es um die Messung der katalytischen Aktivität durch Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten und nichtkatalysierten Esterhydrolyse, ihrer pH - Abhängigkeit und die Messung der thermodynamischen Parameter der hydrolytischen Reaktionen.

Dieser Teil setzt sich auch mit dem Mechanismus der Katalyse auseinander und stellt damit die Beziehung zu den Problemen der Enzymkatalyse her.

Nr.	Verbindung	Summenformel	MG
1		$C_{15}H_{13}O_3NS$ N-(o-Carbomethoxybenzoyl)-o-Aminothiophenol	287
2		$C_{12}H_{14}N_2O_4S$ N-(o-Carbomethoxybenzoyl)-Cysteinamid	282
3		$C_{16}H_{21}N_3O_6S$ Carbobenzoxy-Asparagyl (βmethylester)-α-Cysteinamid	383
4		$C_{22}H_{25}O_6N_3S$ Carbobenzoxy-Asparagyl (βbenzylester)-α-Cysteinamid	458
5		$C_{17}H_{23}N_3O_6S$ Carbobenzoxy-Glutamyl (γmethylester)-α-Cysteinamid	399
6		$C_{17}H_{23}N_3O_6S$ Carbobenzoxy-Glutamyl (αmethylester)-γ-Cysteinamid	399

Tab. 1: Modellverbindungen zum Studium der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse.

Nr.	Verbindung	Summenformel	MG
7		$C_8H_8O_2S$ o-Mercaptomethyl- benzoesäure	287
8	Z-Asp-CysNH ₂	$C_{15}H_{19}N_3O_6S$ Carbobenzoxy-Aspara- gyl-Cysteinamid	369
9	Z-Asp-Gly-CysNH ₂	$C_{17}H_{22}N_4O_7S$ Carbobenzoxy-Aspara- gyl-Glycyl-Cystein- amid	426
10	Z-Glu-Gly-CysNH ₂	$C_{18}H_{22}N_4O_7S$ Carbobenzoxy-Glutamyl Glycyl-Cysteinamid	440
11	Z-His-Ala-Gly- Gly-CysNH ₂	$C_{24}H_{32}N_8O_7S$ Carbobenzoxy-Histidyl Alanyl-Glycyl-Glycyl Cysteinamid	577
12	Z-His-Ala-Asp- Gly-CysNH ₂	$C_{26}H_{34}N_8O_9S$ Carbobenzoxy-Histidyl Alanyl-Asparagyl- Glycyl-Cysteinamid	634
13	Z-His-Ala-Asp- GlyOCH ₃ ·HCl	$C_{24}H_{31}N_6O_9Cl$ Carbobenzoxy-Histidyl Alanyl-Asparagyl- Glycinmethylester hydrochlorid	582
14	Z-His-Ala-Glu- Gly-CysNH ₂	$C_{27}H_{36}N_8O_9S$ Carbobenzoxy-Histidyl Alanyl-Glutamyl- Glycyl-Cysteinamid	648

Tab. 2: Modellverbindungen zum Studium der intermolekular katalysierten Esterhydrolyse

II Material und Methoden

1. Material

1.1 Modellverbindungen zur Esterhydrolyse

In Tabelle 1 sind die zum Studium der Esterhydrolyse synthetisierten Verbindungen aufgeführt.

Vor jeder Meßreihe wurden die Substanzen auf chromatographische Einheitlichkeit überprüft und durch Meß- und Analysendaten charakterisiert.

1.2. Estersubstrate

Die katalytische Wirkung der synthetisierten SH - Verbindungen auf die Esterhydrolyse wurde an folgenden Estern untersucht:

- a) p-Nitrophenylacetat (NPA)
- b) L- bzw D-Butyloxycarbonylalanin-p-Nitrophenylester
(L- bzw D-Boc-AlaONp)

Zu a) das verwendete PNA wurde zum Teil von der Firma Merck bezogen und zum Teil synthetisiert [21].

Durch mehrfaches Umkristallisieren aus Benzol war das Produkt weitgehend von p-Nitrophenol zu reinigen.

zu b) L- bzw D-Boc-AlaONp wurde synthetisiert und mehrfach aus EE/PE umkristallisiert.

Substanz	Fp °C	Drehwert (c=1,DMF)
L-Boc-AlaONp	79-80	-54.5
D-Boc-AlaONp	69-70	53.8
NPA	81	-

Tab.3: Schmelzpunkte und Drehwerte der Estersubstrate

1.3 Puffersystem

a) Zur Messung der Esterhydrolyse

Zur Messung der Hydrolysegeschwindigkeiten wurde im pH - Bereich von 6-8 ein Sörensen Phosphatpuffer benutzt und im Bereich von 8-9 ein Boratpuffer.

b) Zur photometrischen Messung der Dissoziationskonstanten der SH - Gruppe.

Die photometrische pK - Wertbestimmung nach Benesh erfolgte in einem Phosphat/Borat Puffersystem.

Die Stammlösungen (0,04 n Phosphorsäure und 0,04 n Borsäure) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und mit Natronlauge auf den gewünschten pH - Wert im Bereich von 6-12 eingestellt.

c) Zur Bestimmung des SH - Gehalts

Zur SH - Bestimmung nach Ellmann konnten die Sörensen Phosphatpuffer von pH 7 und pH 8 verwendet werden.

Da Differenzen in der Ionenstärke der einzelnen Puffer einen Einfluß auf die Dissoziationskonstante haben, wurden alle verwendeten Puffer durch Zusatz von NaCl auf eine konstante Ionenstärke von 0,2 M eingestellt.

Alle Pufferlösungen wurden sorgfältig mit entgastem H_2O angesetzt und vor den Messungen mit Argon begast.

1.4. Geräte

Die Messungen wurden mit Hilfe folgender Geräte durchgeführt:

Spektralphotometer: BECKMANN ACTA III mit temperierbarem

Küvettenhalter, Probenwechselautomatik und Schreiber.

pH - Meter: RADIOMETER PHM 26, RADIOMETER PHM 64 RESEARCH mit verschiedenen Einstab- und Zweistabmeßketten der Firma Ingold und Metrohm.

pH - stat: RADIOMETER bestehend aus: Titrator TTT 11, Motorbürette AB 11, Schreiber SBR 2c und folgenden Elektroden: Einstabmeßkette METROHM EA 147U, Mikro - Zweistabmeßkette von RADIOMETER Glaselektrode G2222C, Kalomelelektrode K 4112.

Thermostat: Kryomat MWG LAUDA K2RD und MWG LAUDA WB 2058

2.1. Messungen der intermolekularen Esterhydrolyse.

Die Lösungen von NPA und Boc-AlaONp waren 10^{-2} M in MeOH. Wenn in Tab. 4 nicht anders beschrieben, betrug das Konzentrationsverhältnis 1:10. Die Stammlösungen der Katalysatoren wurde mit Ausnahme der Verbindungen 12 und 13, die sich gut in Puffer von pH 7.00 lösten, alle in MeOH angesetzt.

Meßvorgang

In eine Meßküvette wurden 3 ml Puffer gegeben, 30 μ l Katalysatorlösung zugefügt, und die Reaktion mit 30 μ l NPA bzw Boc-AlaONp - Lösung gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde bis zu einem Drittel der vollständigen Umsetzung verfolgt. Zur Erreichung der Endwerte erwärmte man die Proben 30 min auf 65° C, temperierte wieder auf Meßtemperatur und bestimmte die Extinktion. Die Endwerte werden nach 12 h auf ihre Konstanz überprüft. Mit den Proben zur Messung der Spontanhydrolyse wird analog verfahren.

Da mit einigen Katalysatoren die Hydrolysen bei den angegebenen Konzentrationsverhältnissen so schnell verliefen, daß sie nicht mehr mit genügender Genauigkeit zu verfolgen waren, wurden die Katalysatorkonzentrationen wie in Tab. 4

aufgeführt, gesenkt.

Die Reaktionen verliefen auch bei den veränderten Konzentrationsverhältnissen nach 1. Ordnung.

Verb.	Meßbed. und Substrat	Verhältnis [E]:[K]
10	NPA 45°C alle Boc-AlaONp Messungen	1 : 5
11	NPA 45°C alle Boc-AlaONp Messungen	1 : 3
12	NPA 45°C alle Boc-AlaONp Messungen	1 : 4 1 : 2

Tab. 4: Konzentrationsverhältnisse zur Messung der Esterhydrolyse bei Katalysatoren mit hohen Hydrolysegeschwindigkeiten.

2.2 Messung der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse

Die Geschwindigkeiten der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse wurden nach der pH-stat-Methode gemessen.

Es wurden 5 ml Reaktionslösung (Endkonzentration an Ester 4×10^{-4} M) in dem thermostatisierten geschlossenen Reaktionsgefäß unter Begasung mit Argon mit 0,1 n NaOH titriert. Durch Zusatz von 0,1 m NaCl wurden Elektrodenschwankungen verhindert. Der Reaktionsverlauf wurde bis zu zwei Drittel der vollständigen Umsetzung verfolgt, da alle Kurven wegen der Schwierigkeit der Endwertbestimmung nach Guggenheim[22] ausgewertet wurden.

Die Stammlösungen aller Ester wurden in MeOH angesetzt und sorgfältig mit Argon begast. Der MeOH - Gehalt im Reaktionsgefäß überstieg nie 10%.

2.3. Messungen mit konstanter Katalysatorkonzentration und steigender Esterkonzentration.

Mit den Modellverbindungen zur intermolekular SH-katalysierten Esterhydrolyse wurden Meßreihen durchgeführt, bei denen die Katalysatorkonzentration konstant blieb und die Esterkonzentration zunahm. Aus Löslichkeitsgründen konnte bei diesen Versuchen nur NPA als Ester benutzt werden.

Die Konzentrationsverhältnisse waren analog [23] folgendermaßen gewählt:

c_{Kat} : 50 μM

c_{NPA} : 3 - 30 $\times 10^{-4}$ M (zehn verschiedene Konzentrationen)

Alle Messungen wurden bei pH 7.59 und 35° C durchgeführt. Es wurden die ersten zehn Minuten der Reaktion verfolgt und die Anfangsgeschwindigkeit berechnet. Bei jeder katalysierten Reaktion mußte die entsprechende Spontanhydrolyse berücksichtigt werden.

Bei einigen Verbindungen war, vor allem bei niedrigen und hohen Esterkonzentrationen, die Differenz der Geschwindigkeiten gering, dadurch ergab sich bei einigen Meßwerten eine Schwankung.

■

2.4. Bestimmung der pK - Werte

2.4.1. pK - Werte der SH - Gruppe

a) Methode nach Benesh und Benesh [24].

Prinzip der Bestimmung:

Die Bestimmungsmethode beruht auf der UV - Absorption des Thiolatanions. Die undissoziierte SH - Gruppe zeigt im Meß-

bereich keine Absorption, bei den verschiedenen pH - Werten wird nur der Anteil an dissoziierter Verbindung erfaßt. Trägt man die Extinktion in Abhängigkeit vom pH - Wert auf, so erhält man eine Titrationskurve, aus der der pK - Wert ermittelt werden kann.

Durchführung:

Die Messungen wurden von pH 6 - 12 in Argon begasten Puffern durchgeführt. Die für die einzelnen Verbindungen günstige Wellenlänge variierte im Bereich von 220 - 240 nm und wurde vor der Messung durch Aufnahme eines UV - Spektrums bei verschiedenen pH - Werten bestimmt.

Störfaktoren:

Da bei einigen Verbindungen eine pH - Abhängigkeit der Thiolatabsorption zu beobachten war, und generell die Bestimmung bei Anwesenheit von mehreren funktionellen Gruppen, zwischen denen ein Protonentransfer stattfinden kann, nicht unproblematisch ist [25], war diese Methode zur pK - Wertbestimmung nicht bei allen Verbindungen anzuwenden. Bei Nachbarstellung der SH - Gruppe zum Aromaten kam es zur Absorptionsüberlagerung, und es zeigten sich starke pH - Effekte.

b) Potentiometrische Titration der SH - Gruppe

Der pK - Wert der SH - Gruppe war durch direkte Titration mit 0,1 n NaOH bzw KOH nicht oder nur mit großer Ungenauigkeit zu bestimmen. Bei den SH - Verbindungen mit zusätzlicher Estergruppe im Molekül trat während der Titration zum Teil erhebliche Verseifung ein, so daß sich keine auswertbaren Titrationskurven ergaben.

Auch bei den übrigen SH - Verbindungen machte sich bei pH - Werte über 8 ihre Alkaliempfindlichkeit bemerkbar. Trotz intensiver Begasung kam es zu Nebenreaktionen und bei der Titration wurde kein Endpunkt erhalten.

- c) Bestimmung der pK_{SH} - Werte aus der pH - Abhängigkeit der Umsetzung mit Chloracetamid nach dem Lindley - Verfahren [26,27].

Prinzip:

Die SH - Verbindung wird bei verschiedenen definierten pH Werten mit einem Überschuß an Chloracetamid umgesetzt. Da bei der nukleophilen Substitution das Thiolatanion der eigentliche Reaktionspartner ist, verläuft die Reaktion umso schneller je höher der pH - Wert d.h. je mehr Thiolatanion vorliegt. Aus den Reaktionsgeschwindigkeiten 1. Ordnung sind nach Auftragen im Lindley - Diagramm die pK - Werte zu entnehmen.

Durchführung:

Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgt im pH - stat, d.h. die während der Umsetzung entstehende HCl wird unter Konstanthaltung des pH - Werts automatisch mit NaOH neutralisiert.

Nach Lösen der SH - Verbindung in 0,1 n NaCl - Lösung und Einstellen des gewünschten pH - Wertes, wurde die Reaktion unter Zugabe von Chloracetamid (im Überschuß) gestartet. Der Reaktionsverlauf wurde über 30 min verfolgt. Nach Zugabe eines Überschußes Jodacetamid stellte sich innerhalb kurzer Zeit der Endwert ein.

Diese Methode zur pK - Wertbestimmung sollte bei Verbindungen angewandt werden, bei denen die zuvor beschriebenen Verfahren nicht durchführbar waren, d.h. bei den Modellverbindungen zur Messung der intramolekularen katalysierten Esterhydrolyse und bei Verbindungen, deren SH und Aromaten - Absorption im UV - Spektrum in Wechselwirkung traten. Im Verlauf der Messungen stellte sich heraus, daß bei den pH - Werten, die noch eine genügend schnelle Alkylierungsreaktion ermöglichten, bereits Esterhydrolyse eintrat und sich beide Reaktionen überlagerten.

Diese Methode konnte daher nur zur Bestimmung des pK - Werts des o-Mercaptomethylbenzoesäure herangezogen werden.

2.4.2 Bestimmung der pK - Werte des Imidazols

Die pK - Werte des Imidazols wurden durch potentiometrische Titration bestimmt. Die Titration erfolgte, um Elektrodenschwankungen auszuschalten, in 0,1 n NaCl unter Argonbegasung im pH - Bereich von 4 - 9.

2.5. Bestimmung des SH - Gehalts nach Ellmann [28].

Prinzip der Bestimmung:

Nach Umsetzen der SH - Verbindung bei pH 8 mit DTNB bildet sich das gemischte Disulfid und pro Mol eingesetzter SH - Verbindung entsteht ein Mol p-Nitrothiophenylanion. Der Absorptionskoeffizient dieser Verbindung beträgt bei der Wellenlänge 412 nm $1,36 \times 10^4$ ($\text{lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Aus der bei 412 nm bestimmten Extinktion kann nach dem Lambert Beerschen Gesetz die SH - Konzentration berechnet werden.

Testansatz:

Reagenz: 39.6 mg DTNB in 10 ml Phosphatpuffer pH 7 gelöst.

In einer 3 ml Küvette werden nacheinander

2 ml Phosphatpuffer pH 8

1 ml der Lösung mit unbekanntem SH - Gehalt

10 μl DTNB - Lösung

zusammengegeben, fünf Minuten stehengelassen und bei der angegebenen Wellenlänge gemessen.

3. Methoden zur Auswertung der kinetischen Messungen

3.1. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante 1. 1.Ordnung.

3.1.1. Auswertung nach der Endwertmethode

Bei der Endwertmethode erfolgt die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten nach folgender Gleichung:

$$k_b = \frac{2.303}{t} \lg \frac{E - E_0}{E - E_t} \quad [1]$$

Zur Auswertung wurde der Reaktionsverlauf mindestens bis zu einem Drittel der vollständigen Reaktion verfolgt.

Der Endwert ist bei dieser Methode ein wichtiger experimenteller Parameter, der möglichst genau zu bestimmen ist, da hier auftretende Fehler die gesamte Meßreihe erheblich verfälschen.

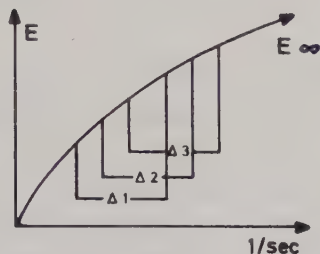
Bei pH - stat Messungen der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse, war es aus technischen Gründen meist nicht möglich die Endwerte mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen, deshalb wurden diese Kurven nach der Guggenheim Methode ausgewertet.

3.1.2. Guggenheim - Methode [22].

Um bei der Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten möglichst genaue Werte zu erhalten, ist es bei der Auswertung nach dieser Methode erforderlich, den Reaktionsverlauf bis zu mindest 70% Umsatz zu verfolgen.

Die Bestimmung beruht auf der Bildung der Extinktionsdifferenzen zu zwei verschiedenen Zeiten und wird umso

genauer, je größer das Zeitintervall gewählt wird.



$$E_t - E = (E_o - E) e^{-kt} \quad [2]$$

$$E_{\Delta t} - E = (E_o - E) e^{-k(t+\Delta t)} \quad [3]$$

$$E_t - E_{\Delta t} = (E_o - E) e^{kt} \times (1 + e^{-k}) \quad [4]$$

$$\ln (E_t - E_{t+\Delta t}) = -kt + \ln (E - E_o) (1 - e^{-k\Delta t}) \quad [5]$$

$$y = -kt + \text{const.}$$

Trägt man $\ln (E_t - E_{t+\Delta t})$ gegen t auf, so ist aus der Steigung der Geraden die Geschwindigkeitskonstante zu bestimmen.

Von den ermittelten beobachteten Geschwindigkeiten 1. Ordnung muß noch der Wert der Spontanhydrolyse k_w des eingesetzten Esters abgezogen werden, um die Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung zu erhalten.

$$k_1 = k_D - k_w \quad [6]$$

3.2. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung.

Durch Division des Werts der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung durch die Konzentration des eingewogenen Katalysators erhält man die scheinbare Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung.

$$k'_2 = \frac{k_1}{c} \quad [7] \quad \text{c muß eventuell durch den nach Ellmann best. SH - Gehalt korrigiert werden.}$$

Unter Berücksichtigung des Dissoziationsgrads α , der aus dem pK - Wert der SH - Gruppe mit Hilfe der Gleichung

$$pH - pK = \lg \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad [8]$$

berechnet wird, erhält man die wahre Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung.

$$k_2 = \frac{k_1}{\alpha c} \quad [9]$$

Diese Konstante erlaubt es, die verschiedenen Modellverbindungen bezüglich ihrer Esteraseaktivität zu vergleichen. k_2 sollte pH unabhängig sein.

3.3. Bestimmung der kinetischen pK - Werte und der pH unabhängigen Geschwindigkeitskonstanten k_2 nach Lindley [26,27],

Aus der pH Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_2' ergibt sich, daß die Geschwindigkeit der Esterhydrolyse vom Dissoziationsgrad des Katalysators abhängt. Wenn man annimmt, daß die deprotonierte Form der SH - Verbindung den Katalyseschritt einleitet, ist die Reaktionsgeschwindigkeit proportional zur Konzentration des Anions.

$$v = k_{S^-} [RS^-][EST] \quad [10]$$

Unter Berücksichtigung des MWG für die Dissoziation ergibt sich folgend Beziehung:

$$k_{SH} = k_{S^-} \frac{K_{Diss}}{K_{Diss} [H^+]} \quad [11]$$

Diese Formel beschreibt die Abhängigkeit der Reaktionskonstanten bei verschiedenen pH - Werten von dem jeweiligen Dissoziationsgrad.

Die reziproke Form dieser Gleichung bezeichnet man als Lindley Formel:

$$\frac{1}{K_{SH}} = \frac{1}{K_{S^-}} \frac{[H^+]}{K_{Diss} \cdot K_{S^-}} \quad [12]$$

Die graphische Darstellung $1/K$ gegen $[H^+]$ liefert eine Gerade, aus deren Ordinatenabschnitt die pH unabhängige Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung entnommen werden kann. Durch den Abzissenabschnitt ist der pK - Wert bestimmt.

3.4. Brönsted - Katalyse - Gesetz [29].

Die Effektivität einer allgemeinen Basen bzw Säure - Katalyse nimmt mit der Basen- bzw Säurestärke des verwendeten Katalysators zu.

Trägt man den Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit vom pK - Wert auf, so ergibt sich eine Gerade.

Im Falle der NPA - Hydrolyse durch Imidazol und SH - Verbindungen wird dieser Zusammenhang quantitativ durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\lg k_2 \text{ Imid} = 0.8 \text{ pK} - 4.3 \quad [13]$$

$$\lg k_2 \text{ SH} = 0.38 \text{ pK} - 0.75 \quad [14]$$

Das Gesetz wurde anhand von einfachen Modellverbindungen aufgestellt und beschreibt daher auch nur die einfache, durch keine kooperativen und intramolekularen Effekte beeinträchtigte Katalyse.

Die gemessenen k_2 - Werte der synthetisierten Verbindungen wurden mit den nach Brönsted berechneten Werten verglichen. Aus den auftretenden Differenzen konnten Schlüsse auf den Mechanismus und eventuell vorliegende Kooperativität der Katalyse gezogen werden.

3.5. Bestimmung der thermodynamischen Konstanten[30].

Aktivierungsenergie E_A

Aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung wurde nach Arrhenius die Aktivierungsenergie E_A ermittelt:

$$\lg k_2' = \text{Konst.} - \frac{E_A}{2.303 R} \frac{1}{T} \quad [15]$$

E_A ergibt sich aus der Steigung der Geraden nach Auftragen des Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von dem reziproken Wert der Temperatur.

Weitere thermodynamische Parameter

Die Änderung der Aktivierungsenthalpie ΔH , der freien Aktivierungsenergie ΔG und der Entropieänderung ΔS wurde nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$\Delta H = E_A - RT \quad [16]$$

$$\Delta G = - RT \ln \frac{kh}{KT} \quad [17]$$

$$\Delta S = \frac{\Delta G - \Delta H}{T} \quad [18]$$

h - Plancksches Wirkungsquant

K - Boltzmannsche Konstante

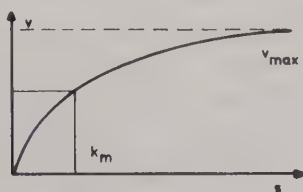
R - allgemeine Gaskonstante

k - Geschwindigkeitskonstante der Reaktion

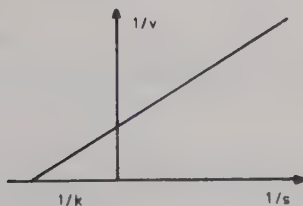
3.6. Auswertung der Kinetik nach Michaelis - Menten [31].

Wenn die katalytische Esterspaltung der Modellverbindungen über einen mit der enzymatischen Esterasereaktion vergleichbaren Mechanismus verläuft, so müßte man annehmen, daß sich in einer schnellen Gleichgewichtseinstellung ein ES analoges Zwischenprodukt KS bildet, das dann wie in der Michaelis Menten Theorie angenommen wird, weiter in wieder regene - rierten Katalysator und Endprodukt zerfällt.

In diesem Fall muß das v/S - Diagramm einen Sättigungs - lauf zeigen, der durch die MM - Gleichung beschrieben wird



Durch Umkehrung von [18] erhält man die Lineveawer - Burck Gleichung, deren graphische Darstellung $- 1/K_m$ als Achsen - abschnitt liefert:



Die so ermittelte MM - Konstante erlaubt den Vergleich der Affinität der verschiedenen Katalysatoren zu NPA und bietet die Möglichkeit, die katalytische Effektivität der Modelle mit der der Enzyme zu vergleichen.

III. Ergebnisse

1. Ergebnisse der Messungen zur intermolekularen Katalyse durch SH - Verbindungen

1.1. pK - Werte der Verbindungen

Die Schwierigkeiten, die sich bei einigen Verbindungen bei der Bestimmung der pK - Werte ergaben, wurden zuvor beschrieben.

Die bei 25° C ermittelten pK - Werte sind unter Angabe der Bestimmungsmethode in Tab. 5 zusammengefaßt.

Verb.	pK _{SH}	pK _{Imid.}	Bestimmungsmethode
7	8,88 ± 0,06	entfällt	Bestimmung n. Lindley.
8	8,78 ± 0,04	entfällt	phot. n. Benesh λ _{max} = 235 nm
9	9,02 ± 0,02	entfällt	phot. n. Benesh λ _{max} = 220 nm
10	9,03 ± 0,03	entfällt	phot. n. Benesh λ _{max} = 230 nm
11	8,77 ± 0,03	6,42 ± 0,04	phot. n. Benesh 230 nm; Imid. pot.
12	9,28 ± 0,04	6,82 ± 0,03	phot. n. Benesh 230 nm; Imid. pot.
13	entfällt	6,83 ± 0,02	pot. Titration

Tab. 5 : pK - Werte der SH - Gruppe und des Imidazol-
restes der synthetisierten Verbindungen bei 25° C.

1.2 Geschwindigkeitskonstanten der durch die untersuchten SH - Verbindungen katalysierten Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat und L- bzw D-Boc-Ala-p-Nitrophenylester.

1.2.1. Ergebnisse der Bestimmungen von k_1 und k'_2 .

Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 der durch die Verbindungen 7-13 katalysierten Esterhydrolyse wurden nach Gleichung [1] und [6] errechnet.

Da das Konzentrationsverhältnis Ester zu Katalysator nicht bei allen Messungen gleich war (Tab. 4), ist auf der Grundlage dieser Konstanten kein direkter Vergleich der katalytischen Effektivität der verschiedenen Verbindungen möglich.

Unter Berücksichtigung der Katalysatorkonzentration erhält man die pH abhängigen scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung.

Bei allen gemessenen Verbindungen konnte zwischen L-Boc-AlaONp und D-Boc-AlaONp als Substrat kein Unterschied in den katalytischen Konstanten gefunden werden. Die k_1 - Werte für die beiden p-Nitrophenylester differieren nur im Bereich der üblichen Fehlerschwankung.

Die ermittelten k'_2 - Werte bei 25° C, 35° C und 45° C für die untersuchten Verbindungen sind in folgenden Tabellen zusammengefaßt. (Tab. 6,7)

Die graphische Darstellung der pH und Temperaturabhängigkeit von k'_2 zeigt für alle gemessenen Verbindungen einen ähnlichen Verlauf. Aus diesem Grund wurde auf die Darstellung aller Werte verzichtet, und nur die Verbindungen mit größter und geringster katalytischer Aktivität als Beispiel aufgetragen. (Abb. 1-4)

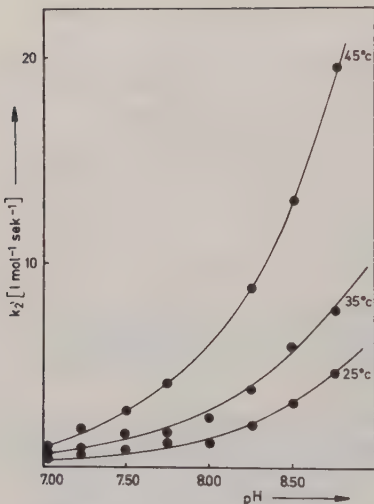


Abb. 1

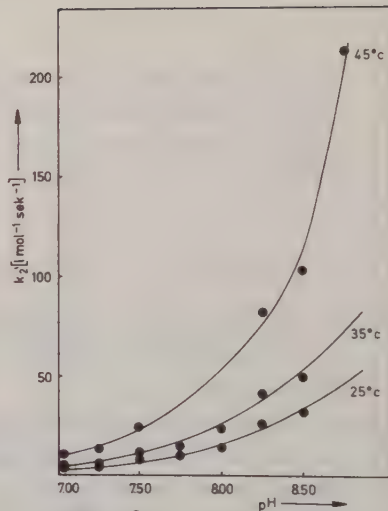


Abb. 2

Abb. 1 und 2:

pH- und Temperaturabhängigkeit der k_2' - Werte der durch Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ (in Abb. 1) bzw. Z-His-Ala-Asp-GlyOCH₃ (in Abb. 2) katalysierten Hydrolyse von NPA.

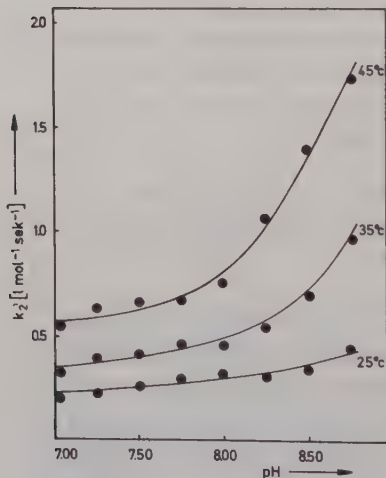


Abb. 3

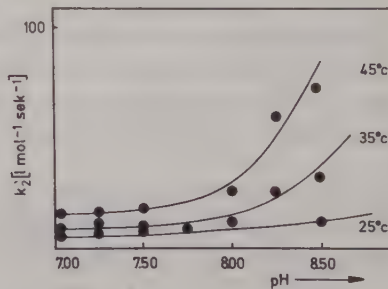


Abb. 4

Abb. 3 und 4:

pH und Temperaturabhängigkeit der k_2' -Werte der durch Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ (in Abb.3) bzw Z-His-Ala-Asp-GlyOCH₃ (in Abb. 4) katalysierten Hydrolyse von Boc-AlaONp.

$k_2' (1 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ <u>bei 25°C</u>							
Verb. pH	7	8	9	10	11	12	13
7,00	0,0272	0,152	0,153	0,185	0,411	0,373	0,199
7,25	0,0323	0,338	0,266	0,329	0,624	0,534	0,236
7,50	0,0810	0,510	0,403	0,536	1,14	0,774	0,268
7,75	-	1,05	0,671	1,01	-	1,07	0,298
8,00	0,142	1,25	1,113	1,53	1,94	1,24	0,317
8,25	0,251	2,37	1,821	2,28	3,10	2,02	-
8,50	0,424	2,66	-	2,89	4,45	3,25	0,349
8,75	-	-	-	4,18	6,48	4,65	0,430
$k_2' (1 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ <u>bei 35°C</u>							
7,00	-	0,320	0,273	0,370	0,890	0,710	0,324
7,25	0,0960	0,920	0,650	0,600	1,500	0,910	0,390
7,50	0,189	1,960	1,250	0,890	-	1,600	0,406
7,75	0,264	2,420	-	1,270	3,100	1,820	0,450
8,00	0,567	2,940	2,530	2,250	4,810	2,360	0,462
8,25	0,930	4,150	-	3,660	7,010	3,950	0,520
8,50	-	7,120	6,590	5,080	9,920	5,980	0,687
8,75	-	8,940	8,730	9,530	11,440	7,830	0,977
$k_2' (1 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ <u>bei 45°C</u>							
7,00	0,109	0,751	0,44	0,73	1,54	0,878	0,55
7,25	0,212	1,67	0,98	1,40	-	1,85	0,64
7,50	0,324	-	1,73	-	5,56	2,73	0,67
7,75	0,508	2,94	2,10	2,39	7,04	4,13	0,69
8,00	-	-	-	3,79	10,10	-	0,75
8,25	-	5,80	3,82	7,20	13,30	8,84	1,21
8,50	-	7,88	5,46	11,88	16,80	13,10	1,39
8,75	-	12,70	6,32	17,72	23,00	19,70	1,74

Tab. 6: pH und Temperaturabhängigkeit der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_2' der durch die Verbindungen 7-13 (siehe Tab.2) katalysierten Hydrolyse von NPA.

		$k_2' (1 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ <u>bei 25°C</u>						
Verb.	pH	7	8	9	10	11	12	13
	7,00	0,247	0,217	2,200	2,050	5,450	2,690	0,620
	7,25	0,465	2,970	2,860	3,81	8,61	4,22	0,74
	7,50	0,783	4,99	4,73	5,60	11,82	7,34	0,80
	7,75	1,14	7,56	8,25	10,62	-	10,48	0,88
	8,00	-	-	-	16,85	20,27	14,60	0,94
	8,25	-	-	-	26,40	30,74	26,23	1,05
	8,50	-	-	-	41,14	49,60	32,85	1,28
	8,75	-	-	-	60,80	65,30	-	-
		$k_2' (1 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ <u>bei 35°C</u>						
	7,00	-	3,81	3,26	3,87	7,07	4,75	0,98
	7,25	-	6,33	5,36	5,30	15,06	6,58	1,12
	7,50	-	12,67	8,38	10,51	-	11,12	-
	7,75	-	15,70	12,30	14,52	22,00	12,94	-
	8,00	-	-	-	27,08	25,79	24,53	1,26
	8,25	-	-	-	45,53	27,70	41,31	2,61
	8,50	-	-	-	62,93	45,45	49,53	3,21
	8,75	-	-	-	-	87,00	83,67	-
		$k_2' (1 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ <u>bei 45°C</u>						
	7,00	-	7,01	4,21	7,81	15,03	9,24	0,55
	7,25	-	11,30	10,00	-	30,00	13,63	0,64
	7,50	-	19,80	12,59	18,48	58,00	23,79	0,67
	7,75	-	-	-	-	-	36,93	0,69
	8,00	-	-	-	45,76	-	43,53	0,75
	8,25	-	-	-	-	-	82,62	1,21
	8,50	-	-	-	-	-	103,32	1,39
	8,75	-	-	-	-	-	212,19	1,74

Tab. 7: pH und Temperaturabhängigkeit der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_2' der durch die Verbindungen 7-13 (siehe Tab.2) katalysierten Hydrolyse von Boc-AlaONp.

Die in Tab. 8 aufgeführten Werte für k_2 sind bei Verbindung 11 und 12 pH abhängig.

Um ein Bild von dem Ausmaß der pH Abhängigkeit der k_2 Werte der einzelnen Verbindungen zu erhalten, sind die k_2 Werte für die verschiedenen pH - Werte in Abb. 5 und 6 aufgetragen.

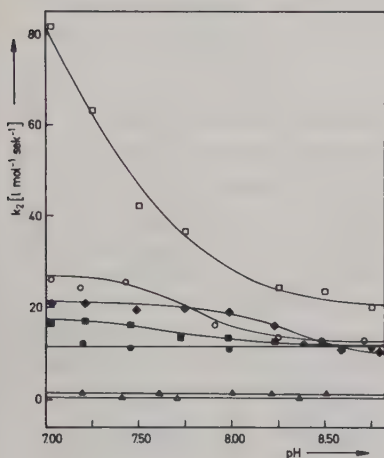


Abb. 5

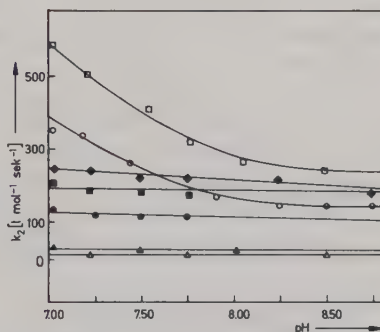


Abb. 6

Abb. 5 und 6:

pH - Abhängigkeit der k_2 - Werte bei 25° C für die Reaktionen der Verbindungen 7 - 13 mit NPA (in Abb. 5) bzw Boc-AlaONp (in Abb. 6).

▲ o-Mercaptomethylbenzoesäure, ● Z-Asp-CysNH₂, ■ Z-Asp-Gly-CysNH₂, ◆ Z-Glu-Gly-CysNH₂, □ Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂, ○ Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂, ▲ Z-His-Ala-Asp-GlyOCH₃.

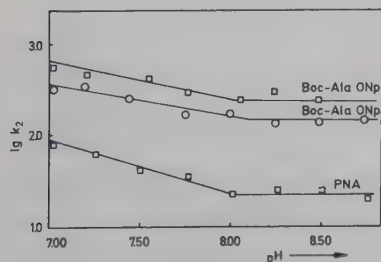


Abb. 7

Abb. 7:

pH - Abhängigkeit der $\lg k_2$ Werte für die Reaktion von Verbindung 11 und 12 mit NPA und Boc-AlaONp.

○ Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂
□ Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂

1.2.2. pH unabhängige Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung der durch SH - Verbindungen intermolekular katalysierten Esterhydrolyse.

Unter Berücksichtigung des Dissoziationsgrads der SH - Gruppe bzw des Imidazols konnte nach Gleichung [9] die wahren Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung errechnet werden.

Diese Konstanten erlauben zum ersten Mal einen direkten Vergleich der katalytischen Fähigkeiten der einzelnen Modellverbindungen.

In Tab. 8 sind die errechneten Werte für die einzelnen Verbindungen und für NPA und Boc-Ala-ONp als Estersubstrate aufgeführt.

k_2 (l mol ⁻¹ sec ⁻¹)		
Verb.	NPA	Boc-AlaONp
7	1,36	16,74
8	11,98	109,00
9	a) 14,32	176,10
10	a) 20,35	a) 218,40
11	a) 25,52	b) 264,40
12	b) 42,24	b) 410,20
13	0,33	1,00

Tab. 8 :
pH unabhängige Geschwindigkeitskonstante k_2 bei pH 7,50 und 25° C.
a) k_2 ist bei diesen Verbindungen bei pH-Werten über 8 pH abhängig.
b) k_2 im gesamten Bereich pH abhängig.

1.2.3. Prüfung der Gültigkeit des Brönsted - Gesetzes.

Die Basizität einer Verbindung drückt sich im pK - Wert aus; das Brönsted'sche Katalysegesetz berücksichtigt zur Berechnung von k_2 nur den pK Wert der Verbindungen, d.h. die berechnete Konstante beruht ausschließlich auf der Basizität der Verbindung. Andere Faktoren, die zu einer negativen oder positiven Beeinflussung der Proportionalität von pK und $\log k_2$ führen, werden nicht berücksichtigt.

In Tab. 9 sind die ermittelten und die nach Gleichung [13] und [14] berechneten k_2 - Werte miteinander verglichen und die Abweichung von den theoretischen Brönsted Werten als Quotient angegeben.

Dieser Vergleich wurde nur für die NPA - Hydrolyse durchgeführt, da für die Boc - AlaONp - Hydrolyse die substratspezifischen Konstanten der Brönsted - Gleichung nicht bekannt sind.

Verbindung	7	8	9	10	11	12	13
k_2 Imid.ber. (1/molmin)	-	-	-	-	10,1	14,5	14,7
k_2 SH ber. (1/molmin)	421,1	385,8	476,0	480,2	380,2	602,5	-
k_2 Imid. + k_2 SH	421,1	385,8	476,0	480,2	390,3	616,0	14,7
k_2 gem. (1/molmin)	81,4	718,6	859,3	1221,1	1530,0	2534,4	20,1
Quotient $k_{2ge}/k_{2be.}$	0,2	1,9	1,8	2,5	3,9	4,1	1,4

Tab. 9 : Vergleich der nach Brönsted berechneten mit den aus den Messungen ermittelten k_2 - Werten der Umsetzung von Verb. 7-13 mit NPA bei 25°C.

1.2.4. Ermittlung der pK - und k_2 - Werte nach Lindley.

Für die Reaktionen für Verbindung 7-13 mit NPA und Boc-AlaONp wurden Lindley Diagramme aufgestellt. In Abb. 8 und 9 sind diese Diagramme von Verb. 12 für die Umsetzung mit NPA und Boc-AlaONp als Beispiel dargestellt. Die Daten aller Verbindungen sind in Tab.10 aufgeführt. Zur Beurteilung der einzelnen Werte wird in der Diskussion Stellung genommen, die die Problematik der graphischen Auswertung berücksichtigt.

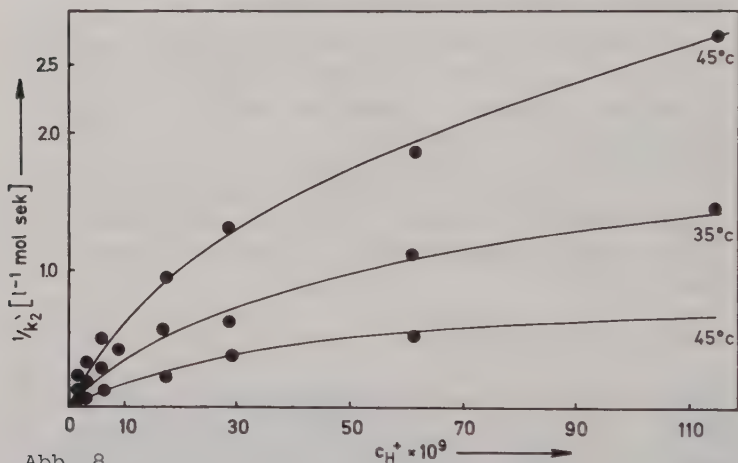


Abb. 8

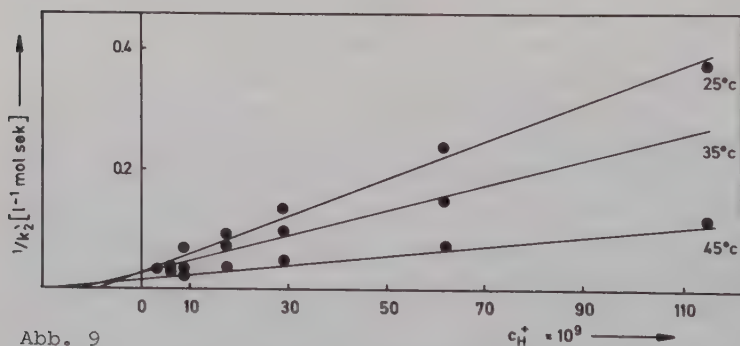


Abb. 9

Abb. 8 und 9:

Lindley-Diagramm der Reaktion von Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ mit NPA (Abb. 8) und Boc-AlaONp (Abb. 9) bei 25°C, 35°C, 45°C.

Verb.	T/°C	pK k_2 (1mol ⁻¹ sec ⁻¹)				Bemer.
		NPA	BAlaONp	NPA	BAlaONp	
7	25	8,76	n.b.	0,91	n.b.	
	35	8,46	n.b.	1,43	n.b.	
	45	8,26	n.b.	1,67	n.b.	
8	25	8,52	8,48	10,00	50,00	*kaum Änder- ung.
	35	8,35	8,32	*	55,60	
	45	8,12	8,12	*	66,70	
9	25	8,46	8,37	4,35	43,48	
	35	8,26	8,20	5,56	44,00	
	45	8,19	8,11	6,17	50,00	
10	25	8,55	8,52	5,88	76,90	
	35	8,43	8,35	8,00	81,30	
	45	8,24	8,20	13,33	100,00	
11	25	8,11	8,08	5,88	66,70	
	35	8,05	7,94	10,87	76,90	
	45	7,97	7,85	19,23	142,90	
12	25	*	8,05	*	34,48	*kein linear. Diagr.
	35	*	7,81	*	37,03	
	45	*	7,69	*	57,14	
13	25	6,80	6,80	0,33	1,00	
	35	6,64	6,64	0,49	1,25	
	45	6,58	6,58	0,80	2,33	

Tab. 10 : Aus den Lindley - Diagrammen ermittelte Parameter pK und k_2 für die Reaktionen von Verbindung 7 - 13 mit NPA und Boc-AlaONp im pH - Bereich von 7,00 - 8,74 bei 25°C , 35°C und 45°C.

1.3. Ergebnisse der kinetischen Studien bei konstanter Katalysatorkonzentration und steigender Substratkonzentration.

Für die Verbindungen 7-13 wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse bei verschiedenen NPA - Konzentrationen und konstanter Katalysatorkonzentration gemessen.

Diese Versuche ergaben bei einem Teil der Verbindungen eine lineare Abhängigkeit der Hydrolysegeschwindigkeit von der Esterkonzentration; bei zwei Verbindungen (11 und 12) resultierte eine hyperbolische Sättigungskurve.

Die Ergebnisse sind im einzelnen in Tab. 11 und Abb.10 und 11 zusammengefaßt.

Verb C _{NPA} x10 ⁴ M	v x 10 ⁶ (Mmin ⁻¹)					
	7	8	9	11	12	13
2,9	0,65	1,27	1,06	1,22	1,46	0,31
5,8	-	1,53	1,64	2,30	2,54	0,58
8,8	-	-	2,29	3,15	3,65	-
11,6	-	3,80	-	4,31	4,92	0,95
14,5	0,55	4,42	3,86	5,56	-	1,49
17,6	0,94	5,04	5,41	5,90	6,18	1,87
20,3	1,04	6,08	5,66	6,35	6,18	2,16
23,2	1,82	7,29	6,62	6,47	6,48	-
26,4	-	9,34	7,80	6,56	6,70	-
29,3	2,02	-	-	-	6,78	-

Tab.11: Einfluß der NPA - Konzentration auf die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse ; 0,2 m Phosphat - Puffer pH 7,59, T=35°C, Katalysatorkonzentration 50 µM.

Abb. 10: Einfluß der NPA - Konzentration auf die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse bei Verbindung

▲ 7, △ 13, ■ 9, ● 8.

Abb. 11: Einfluß der NPA - Konzentration auf die Anfangsgeschwindigkeiten der Hydrolyse bei Verbindung

□ 12, ○ 11.

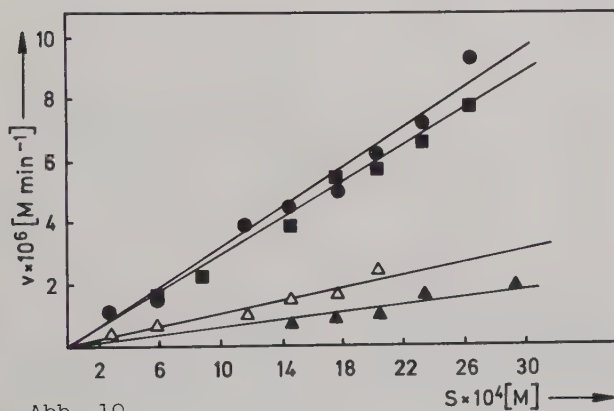


Abb. 10

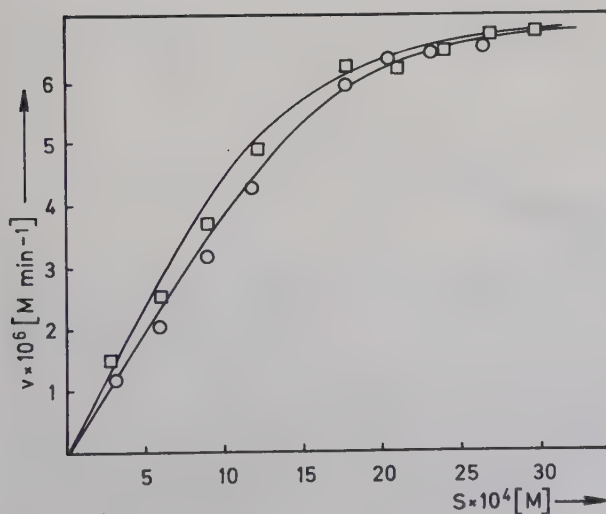


Abb. 11

Trägt man die für Verbindung 11 und 12 ermittelten Werte nach Lineweaver Burck auf, so erhält man eine Gerade (Abb.12 ,Tab.12)

$1/s \times 10^2$	$1/v \times 10^{-5} \text{ (M}^{-1}\text{min)}$	
	Verb. 11	Verb. 12
34,4	8,20	6,85
17,2	4,93	3,94
11,4	3,17	2,71
8,6	2,32	2,03
6,9	1,80	-
5,7	1,65	1,62
4,9	1,57	1,62
4,3	1,55	1,54
3,8	1,52	1,49
3,4	1,37	1,47

Tab.12:

Werte zum Lineweaver Burck Diagramm der Hydrolyse von NPA in Gegenwart von Verb. 11 und 12.

Gemessen in 0,2 m Phosphatpuffer bei pH 7,59, 35°C.

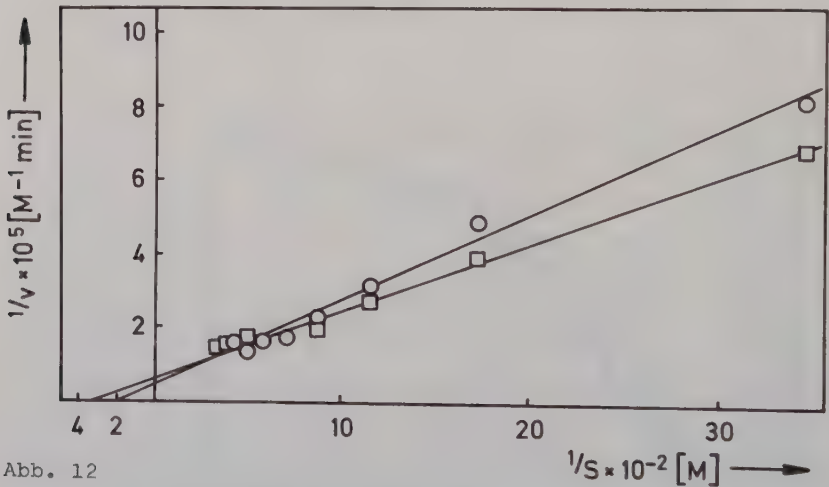


Abb. 12

Abb. 12: Lineweaver Burck Diagramm der Hydrolyse von NPA in Gegenwart von Verb. 11 und 12 ; 0,2 m Phosphatpuffer, pH 7,59, 35°C, Katalysatorkonzentration 50 μM , NPA Konzentration $3 - 30 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Aus den Achsenabschnitten der Geraden wurden folgende Werte für die Michaelis Menten Konstante entnommen:

Verb. 11: $K_m = 5,00 \text{ mMol}$

Verb. 12: $K_m = 2,86 \text{ mMol}$

Bei den Verbindungen 7 und 13 fand unter den angegebenen Versuchsbedingungen keine signifikante Katalyse mehr statt; die mit Katalysator gemessenen Werte lagen nur 10 - 30 % über den bei diesen Konzentrationen hohen Spontanhydrolysen. Die ermittelten Werte dieser Verbindungen können daher nur unter Vorbehalt in die Tabelle aufgenommen werden und dienen nur um Tendenzen aufzuzeigen.

1.4. Thermodynamischen Parameter der intermolekularen Esterhydrolyse.

1.4.1. Dissoziationsenergie

Aus der Temperaturabhängigkeit der nach Lindley ermittelten pK - Werte der Verbindungen 7 - 13 wurden die Dissoziationsenergien ermittelt.

Verb.	$\Delta H_{\text{Diss}} (\text{kcal mol}^{-1})$	
7	11,16	
8	8,97	
9	6,18	Tab. 13:
10	8,03	Werte der graphisch
11	3,13	ermittelten H_{Diss}
12	7,89	der untersuchten
13	4,77	Verbindungen.

1.4.2. Thermodynamische Parameter der intermolekular
katalysierten Esterhydrolyse.

Verbindung	Estersubstr.	E_A	ΔH	ΔG	ΔS
		(kcal/mol)			(Cl)
7 o-Mercapto- methylben- zoesäure	NPA	17,95	17,35	19,59	- 7,5]
	Boc-AlaONp	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
8 Z-Asp- -CysNH ₂	NPA	15,25	14,66	18,57	-13,11
	Boc-AlaONp	11,44	10,85	16,99	-20,59
9 Z-Asp-Gly- CysNH ₂	NPA	9,53	8,94	18,56	-32,26
	Boc-AlaONp	6,54	5,94	16,98	-37,03
10 Z-Glu-Gly- CysNH ₂	NPA	13,46	12,87	18,45	-18,70
	Boc-AlaONp	12,71	12,12	17,03	-16,47
11 Z-His-Ala- Gly-Gly- CysNH ₂	NPA	8,97	8,38	17,98	-32,20
	Boc-AlaONp	9,74	9,14	16,45	-24,52
12 Z-His-Ala- Asp-Gly- CysNH ₂	NPA	8,32	7,73	18,03	-34,50
	Boc-AlaONp	11,73	11,14	16,86	-19,18
13 Z-His-Ala- Asp-GlyOCH ₃	NPA	9,74	9,14	19,00	-31,00
	Boc-AlaONp	9,34	8,75	17,73	-30,12
spontan	NPA	20,50	19,90	23,78	-13,00
	Boc-AlaONp	15,25	14,66	23,10	-28,30

Tab. 14: Thermodynamische Konstanten der durch Verbindung
7-13 intermolekular katalysierten NPA bzw Boc-AlaONp
Hydrolyse.

2. Geschwindigkeitskonstanten der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse.

2.1. pK - Werte der Verbindungen.

Durch die Hydrolyseempfindlichkeit der Substanzen war es nur bei einem Teil der Verbindungen möglich, die pK - Werte zu bestimmen.

Verb.	t/°C	pK _{SH}	Bestimmungsmethode
1	25	ca 8,50	Durch die starke Wechselwirkung mit dem Aromaten war das Thiolatabsorptionsmaximum pH abhängig.
2		n.b.	Bei steigendem pH ändert sich die Extinktion, da zunehmend Hydrolyse eintritt.
3	25	9,05	photometrisch nach Benesh und Benesh $\lambda_{\max} = 230 \text{ nm}$
	35	8,82	
	45	8,46	
5	25	8,93	photometrisch nach Benesh und Benesh $\lambda_{\max} = 235 \text{ nm}$
	35	8,76	
	45	8,64	
6	25	8,95	photometrisch nach Benesh und Benesh $\lambda_{\max} = 230 \text{ nm}$
	35	8,77	
	45	8,63	

Tab. 15: pK - Werte der SH - Gruppen der synthetisierten Verbindungen.

2.2. Ergebnisse der Bestimmungen von k_b und k'_2 .

Die Geschwindigkeitskonstanten der katalysierten Esterhydrolysen wurden nach der Guggenheim - Methode aus den Titrationskurven ermittelt.

Unter Berücksichtigung der bei dem jeweiligen pH - Wert vorliegenden OH - Konzentration wurden die k'_2 - Werte berechnet. Da bei den durchgeführten Messungen der Anteil an organischem Lösungsmittel immer unter 10 % lag, wurde es bei der Berechnung nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse sind in Tab.16 und Tab.17 zusammengefaßt.

Ver.	t°C	k_b (min ⁻¹)				
		pH 8,5	pH 9,0	pH 9,5	pH 10,0	pH 10,5
1	25	-	$3,5 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$
	35	$2,0 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$1,1 \times 10^{-1}$
	45	$7,3 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$4,1 \times 10^{-1}$
2	25	$3,7 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-2}$	$2,0 \times 10^{-1}$	$6,5 \times 10^{-1}$
	35	$1,9 \times 10^{-2}$	$5,9 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-1}$	$6,2 \times 10^{-1}$	1,9
	45	$6,4 \times 10^{-2}$	$2,1 \times 10^{-1}$	$6,0 \times 10^{-1}$	2,0	-
3	25	$7,5 \times 10^{-3}$	$1,3 \times 10^{-2}$	$2,9 \times 10^{-2}$	$6,1 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-1}$
	35	$2,8 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$2,9 \times 10^{-1}$
	45	$8,3 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-1}$	$2,5 \times 10^{-1}$	$4,3 \times 10^{-1}$	$7,2 \times 10^{-1}$
6	25	-	-	-	$4,0 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-3}$
	35	-	-	$3,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-2}$	$3,8 \times 10^{-2}$
	45	-	$3,1 \times 10^{-3}$	$9,1 \times 10^{-3}$	$3,2 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-1}$

Tab.16: pH und Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse der Verbindungen 1, 2, 3 und 6.

Verb.	t°C	k_2' (mol/min ⁻¹)				
		pH 8,5	pH 9,0	pH 9,5	pH 10,0	pH 10,5
1	25	-	$3,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^1$
	35	$6,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
	45	$2,3 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$
2	25	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$
	35	$6,1 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3$
	45	$2,0 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	-
3	25	$2,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$
	35	$8,9 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$9,1 \times 10^2$
	45	$2,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
6	25	-	-	-	$4,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$
	35	-	-	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
	45	-	$3,1 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$

Tab.17: pH- und Temperaturabhängigkeit der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse der Verbindungen 1, 2, 3 und 6.

2.3. Thermodynamische Parameter der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse.

Aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten wurden nach den Gleichungen [16], [17] und [18] folgende thermodynamischen Größen ermittelt:

Verbind.	E_A (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔG (Kcal/mol)	ΔS (Cl)
1	26,9	26,3	19,9	-21,5
2	24,7	24,1	18,4	-19,1
3	22,9	22,3	19,1	-10,7
6	26,1	25,6	20,7	-16,4

Tab.18: Thermodynamische Konstanten der intramolekular katalysierten Esterhydrolyse der Verb. 1, 2, 3 und 6.

V. Diskussion

1. Zentrales Thema der vorliegenden Arbeit ist die Frage, in wie weit die nukleophile Reaktivität der SH - Gruppe und des Imidazolrestes, die beide bei der Enzymkatalyse eine wichtige Rolle spielen, durch Nachbargruppeneffekte beeinflusst werden kann. Als Maß für die Nukleophilie wurde die Katalyse der Hydrolyse von NPA und Boc-AlaONp durch verschiedene Imidazol- und SH - Verbindungen in erster Linie auf der Basis von Histidyl- und Cysteinylpeptiden verwendet. Der Mechanismus dieser Katalyse ist bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen, die u.a. zu dem Ergebnis geführt haben, daß eine kovalente Katalyse vorliegt, d.h. daß Thiolester bzw Acylimidazol als Zwischenprodukte der Esterhydrolyse auftreten. Der Beweis für diese Intermediate konnte durch Isolierung der Acylverbindungen [32,33] durch UV - spektroskopische Analyse ihrer Bildung und ihres Zerfalls [34] und indirekt durch kinetische Messungen erbracht werden.

1.1. Charakteristik der Nukleophilen Katalyse.

Nach Jencks [35] muß ein idealer nukleophiler Katalysator folgende Voraussetzungen erfüllen:

- a) Die nukleophile Reaktivität der katalytisch aktiven Gruppe muß größer sein, als die des endgültigen Acylgruppenacceptors.
- b) Das entstehende aktivierte Zwischenprodukt muß reaktiver sein als das Substrat.
- c) Das Zwischenprodukt muß thermodynamisch instabiler sein als das Reaktionsprodukt.

Betrachtet man die SH - Gruppe und den Imidazolrest der untersuchten Verbindungen zunächst unabhängig von ihrer Um-

gebung unter dem Gesichtspunkt dieser Kriterien, kommt man zu folgenden Ergebnissen:

Zu a) Die nukleophile Reaktivität einer funktionellen Gruppe ist abhängig von ihrer Basizität und Polarisierbarkeit. In der Reihe Stickstoff - Sauerstoff - Schwefel nimmt die Basizität ab und die Polarisierbarkeit aufgrund des zunehmend ausgedehnten Elektronensystems zu.

In Hinblick auf seine Nukleophilie und Basizität zeichnet sich Imidazol durch einige besondere Eigenschaften aus, die verständlich machen, daß gerade dieser Heterocyclus eine so bedeutende Rolle bei der Enzymkatalyse (im wässrigen Milieu und bei neutralen pH - Wert) spielt [35]. Imidazol ist die erste organische Base, die als Katalysator für eine Esterhydrolyse beschrieben wurde. Je nach Struktur des Esters kann Imidazol dabei in einer nukleophilen oder Basenkatalyse wirksam werden. Wegen seines schwach basischen Charakters vermag Imidazol die stark basischen Alkoxidionen nicht zu verdrängen; eine nukleophile Katalyse läuft daher nur mit aktivierten Estern mit einem schwach basischen Alkoholanteil vom Typ des NPA ab.

Imidazol ist ein tertiäres Amin dessen Substituenten am Stickstoff in einem aromatischen fünfgliedrigen Ringsystem so fixiert sind, daß sie nur eine geringe sterische Hinderung bewirken, wodurch die gegenüber primären und sekundären Aminen erhöhte nukleophile Reaktivität voll zur Wirkung kommt; es ist mit einem pK - Wert von 7 die stärkste Base am Neutralpunkt, das gewährleistet auch ein Maximum an nukleophiler Reaktivität bei physiologischen pH - Werten.

Im Vergleich zum Stickstoff ist die Basizität des Schwefels zwar schwächer, die Polarisierbarkeit aber stärker ausgeprägt. Die nukleophile Reaktivität der SH - Gruppe ist daher verglichen mit der des Imidazols erheblich größer.

Als endgültiger Acylgruppenacceptor fungiert bei den untersuchten Reaktionen das Wasser. Die nukleophile Reaktivität

des Wassers ist auf jeden Fall geringer als die der SH - Gruppe bzw. des Imidazolrestes, so daß die erste Forderung von beiden katalytisch aktiven Gruppen erfüllt ist.

zu b) Um vollständige Reaktion zu gewährleisten muß das Zwischenprodukt reaktiver sein als das Endprodukt. Bei der Umsetzung von Imidazol mit Nitrophenylestern bildet sich ein N - Acylimidazol, eine Verbindung die nur in sehr geringem Maße resonanzstabilisiert ist; da das freie Elektronenpaar am Stickstoff mit in das Elektronensystem des aromatischen Rings einbezogen ist, kann es keinen Beitrag zur Resonanzstabilisierung liefern. Aus diesen besonderen Eigenschaften des Imidazols resultiert eine für Säureamidbindungen ungewöhnlich starke Polarisierung und damit Reaktivität, so daß diese Zwischenstufe leicht der Hydrolyse unterliegt.

Bei S - Acylverbindungen (Thiolester) sind die Verhältnisse ähnlich: um ideale Resonanzstabilisierung zu erreichen, müßte der Schwefel sein Elektronenpaar mit in die Bindung einbringen, d.h. er müßte leichten Doppelbindungscharakter aufweisen. Als Element der zweiten Periode besitzt der Schwefel jedoch keine Tendenz zur Ausbildung einer Doppelbindung, dadurch ist auch diese Bindung polarisiert d.h. aktiviert.

Aus diesen Fakten ergibt sich, daß die beiden entstehenden Zwischenprodukte der durch SH und Imidazol katalysierten Hydrolyse von Nitrophenylestern weit reaktiver sind, als der resonanzstabilisierte Sauerstoffester des Substrats. Damit ist die zweite Voraussetzung für eine nukleophile Katalyse erfüllt.

Zu c) Die Erfüllung der dritten Forderung ist direkt meßbar. Für die freie Energie der Hydrolyse des Substrats und der auftretenden Zwischenprodukte können folgende Werte miteinander verglichen werden [36]:

Acetylimidazol	$\Delta F = - 13,0$	(pH7, 25°C)
Thioester	$\Delta F = - 7,5$	(pH7, 25°C)
NPA	$\Delta F = - 13,0$	(pH7, 25°C)

1.2. Kooperative nukleophile Katalyse.

Die obigen Überlegungen berücksichtigen nicht die chemische Umgebung der katalytisch wirksamen Gruppe. Aus zahlreichen Modelluntersuchungen ist bekannt, daß die nukleophile Reaktivität durch Nachbargruppeneffekte erheblich variiert werden kann. So steigt z.B. die pH unabhängige katalytische Konstante beim Übergang von Cysteinäthylester zum Cystein bei pH 7,00 von $133 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ auf $351 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ [2]. Eine drastische Zunahme der Reaktivität zeigt sich auch beim Vergleich von reinen SH - Verbindungen mit solchen, die neben einer SH - Gruppe noch einen Imidazolrest im Molekül enthalten; z.B. wird für 4-[2-Mercaptoäthyl]-imidazol bei der Katalyse der NPA - Hydrolyse eine katalytische Konstante von $2400 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ [6], das bedeutet eine Erhöhung auf etwa das 20-fache der katalytischen Aktivität einer reinen SH - Verbindung, ermittelt.

Diese Erhöhung der nukleophilen Reaktivität von SH - Gruppen durch Nachbargruppeneffekte soll im folgenden anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit näher diskutiert werden.

2. Die kooperative Katalyse als Weg zur Erhöhung der nukleophilen Reaktivität der Thiolgruppe und des Imidazolrestes.

In der vorliegenden Arbeit wurden Verbindungen synthetisiert, die eine ideale Nachbarschaft von Imidazol und Carboxylgruppe, Thiol- und Carboxylgruppe, Imidazol- und Thiolgruppe und schließlich Imidazol-, Thiol- und Carboxylgruppe ermöglichen, wobei die Positionen dieser Gruppen zueinander auch noch

variiert wurden. Damit ist die Möglichkeit gegeben, den Einfluß einer ideal benachbarten Carboxylgruppe auf die Reaktivität eines Imidazolrestes oder einer Thiolgruppe, den Einfluß eines Imidazolrestes auf die Reaktivität einer Thiolgruppe und schließlich den simultanen Einfluß eines Imidazolrestes und einer Carboxylgruppe auf die Reaktivität einer Thiolgruppe zu untersuchen. Die Hydrolyse von Nitrophenylestern, eine nukleophile Verdrängungsreaktion, wurde in allen Fällen als Testreaktion für die Variation der Nukleophilie des Imidazols oder Thiols verwendet.

Es bleibt zunächst die Frage offen, ob die zu beobachtende Erhöhung der Hydrolysegeschwindigkeiten der Ester durch Nachbargruppeneffekte auf einer direkten Aktivierung des nukleophilen Zentrums oder einem gleichzeitigen Angriff der benachbarten funktionellen Gruppen auf die Estergruppierung des Substrats beruht.

Um von seiten des Substrats eine gewisse Variation in Struktur und Reaktivität zu gewährleisten, wurde außer NPA auch Boc-Ala-p-Nitrophenylester mit in die Untersuchungen einbezogen. Die charakteristische Kombination der funktionellen Gruppen und die dazu synthetisierten Verbindungen sind in der nachstehenden Tabelle zusammengestellt.

Katalytisch wirksame Gruppen	synth. und unters. Verbindung
COOH/Imidazol	Z-His-Ala-Asp-GlyOCH ₃
COOH/SH	o-Mercaptomethylbenzoe S. Z-Asp-CysNH ₂ Z-Asp-Gly-CysNH ₂ Z-Glu-Gly-CysNH ₂
Imidazol/SH	Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH ₂
Imidazol/COOH/SH	Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH ₂

Tab. 19: Synthetisierte Katalysatoren und die in ihnen kooperativ wirksamen funktionellen Gruppen.

2.1. Thiol-, Carboxyl- und Imidazol katalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylacetat.

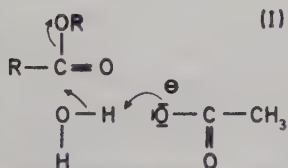
2.1.1. Spontanhydrolyse

Die NPA - Spontanhydrolyse wurde mehrfach untersucht [37,38,39] Die Reaktion verläuft autokatalytisch nach einer einheitlichen Reaktion 1. Ordnung [40] ; die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Basen erheblich gesteigert und ist leicht von der Ionenstärke des Reaktionsmedium abhängig [41].

2.1.2. Katalytische Wirkung der Carboxylgruppe auf die Esterhydrolyse.

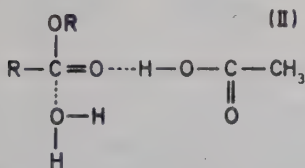
Als Mechanismen der Katalyse der Esterhydrolyse durch Carbonsäuren kommen je nachdem, in welchem pH - Bereich die Reaktion abläuft zwei Möglichkeiten in Frage:

a) allgemeine Basenkatalyse:



Durch die Basizität des Carboxylat-anions wird ein Proton des Wassers gelockert und dadurch der nukleophile Angriff des Wassers erleichtert. (sog. "Wasseraktivierung")

b) allgemeine Säurekatalyse:



Polarisation der Estercarbonylgruppe durch Bildung einer H-Brücke mit der aktivierenden Säure und dadurch Erleichterung des Angriffs eines Wassermoleküls.

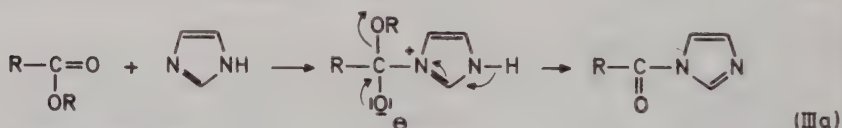
Die durch die Carboxylgruppe bewirkte Katalyse der NPA - Hydrolyse ist nicht sehr effektiv, deshalb finden sich zu diesem Punkt nur wenige Untersuchungen in der Literatur. Als Beispiel für die Größenordnung der katalytischen Kon-

stanten wird hier nur der k_2 - Wert der durch Essigsäure katalysierten Umsetzung aufgeführt: $k_2 = 5,62 \cdot 10^{-4} \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei pH 7,00 und 25° C [42].

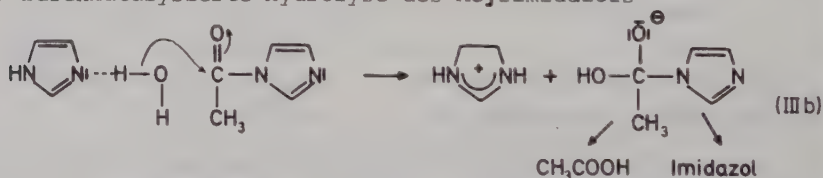
2.1.3. Katalytische Wirkung des Imidazols auf die Esterhydrolyse.

Aus zahlreichen Untersuchungen der Imidazol katalysierten NPA - Hydrolyse [4,43,44,45] ergibt sich für k_2 bei 25° C ein Wert von $25 - 35 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Als Mechanismus der Umsetzung wird eine nukleophile basenkatalysierte Reaktion angenommen, in der beide Funktionen durch das Imidazolmolekül übernommen werden und intermediär ein Acylimidazol auftritt:

a) nukleophiler Angriff



b) basenkatalysierte Hydrolyse des Acylimidazols



2.1.4. Katalytische Wirkung der SH - Gruppe auf die Esterhydrolyse.

Die durch SH - Verbindungen katalysierte Esterhydrolyse verläuft, wie spektroskopisch nachgewiesen werden kann [2] über Thioesterbildung.

Die meisten in der Literatur als Katalysatoren untersuchten SH - Verbindungen sind mindestens bifunktionell, so daß es Schwierigkeiten bereitet Angaben über katalytische Fähigkeiten reiner SH - Verbindungen zu machen. In die

folgende Tabelle wurden auch Werte von bifunktionellen Verbindungen aufgenommen, bei denen auf Grund der Untersuchungsergebnisse nicht mit einer Kooperativität zwischen den einzelnen Gruppen zu rechnen ist.

Verbindung	k_2 ($\text{lmol}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Lit
n-Acetyl-Cysteinamid	120	[45]
Cysteinäthylester	133	[3]
2-Mercaptoäthanol	182	[41,42]
2-Mercaptoäthylamin	225	[3]

Tab.20 Geschwindigkeitskonstanten der Katalyse der NPA Hydrolyse durch SH - Verbindungen ohne kooperative Effekte.

2.2 Katalyse der Esterhydrolyse durch Zusammenwirken von Carboxyl- und Imidazolrest.

Zum Studium einer möglichen Imidazol-Carboxyl-Katalyse wurde Z-His-Ala-Asp-GlyOCH₃ synthetisiert und die Wirkung dieses geschützten Tetrapeptids auf die NPA - Hydrolyse untersucht. Es wurde eine pH unabhängige katalytische Konstante k_2 von 20,04 $\text{lmol}^{-1}\text{min}^{-1}$ ermittelt.

Diese Größe liefert nur im Vergleich mit analog gebauten Verbindungen eine Aussage über die Effektivität der Katalyse. In Tab.21 sind daher einige vergleichbare Verbindungen mit den jeweiligen pK - Werten und katalytischen Konstanten aufgeführt.

Verbindung	pK	k_2 (l mol ⁻¹ min ⁻¹)	Lit.
1 Z-His-Ala-Asp-GlyOR	6,83	20,04	
2 His x HCl	6,00	5,70	[4]
3 Poly His	6,00	3,50	[4]
4 Copoly His, Asp	7,00	7,40	[4]
5 Copoly His, Glu	7,00	5,10	[4]
6 Z-His	7,06	30,48	[47]
7 Imidazol	7,00	35,00	[43,44,45]
8 cis Urocaninsäure	6,82	13,86	[48]
9 trans Urocaninsäure	5,81	2,40	[48]

Tab 21: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten der durch Imidazol- / COOH - Verbindungen katalysierten NPA Hydrolyse.

Trägt man den Logarithmus der k_2 - Werte der Verbindungen gegen ihre pK - Werte auf und zeichnet in diese Darstellung, die bei einer reinen Imidazolkatalyse zu erwartende Brönsted-Gerade (berechnet nach Gleichung 13), so ergibt sich folgendes Bild:

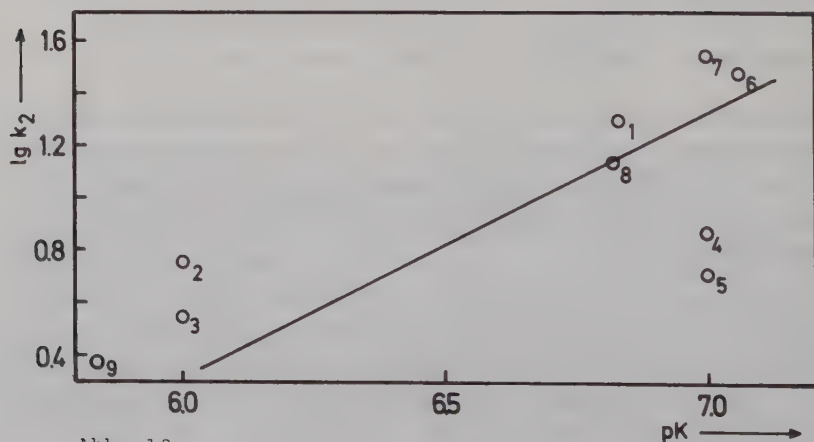


Abb. 13

Abb.13: Brönsted - Gerade für die durch Imidazol Verbindungen katalysierte NPA - Hydrolyse und gefundene $\lg k_2$ Werte der durch Imidazol-COOH-Verbindungen beschleunigten Hydrolyse dieses Esters.

Bei einem Imidazol pK-Wert von 6,83 ist bei dem Tetrapeptid nach Brönsted mit einer katalytischen Konstanten von $14,4 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zu rechnen. Die ermittelte Konstante von $20,1 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ beträgt 140 % des errechneten Wertes. Aus diesem Ergebnis kann man schließen, daß außer der im pK - Wert zum Ausdruck kommenden Basizität des Imidazols noch andere Faktoren für die Effektivität der Katalyse entscheidend sind.

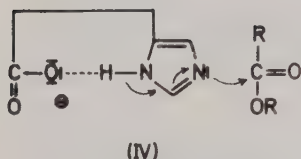
Es bestehen zwei Möglichkeiten:

a) Modelluntersuchungen zur histidinkatalysierten Esterhydrolyse haben gezeigt, daß His - Derivate bzw. Peptide mit aromatischen Resten eine Erhöhung der katalytischen Konstanten der NPA - Hydrolyse bewirken. [47,49,50]. . Man stellt sich eine Wechselwirkung zwischen dem Aromaten des Esters und des Histidin - Derivates vor, was in etwa einer Enzym - Substrat - Komplex analogen Vororientierung der Reaktionspartner entspricht und dadurch eine effektivere Katalyse bewirkt.

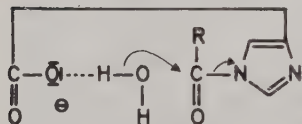
Es besteht also die Möglichkeit, daß die 40 %ige Erhöhung des k_2 - Wertes auf einer Vororientierung der Reaktanten durch den Aromaten des Cbo - Restes beruht.

Eine derartige Vororientierung der Reaktionspartner müßte sich auf die thermodynamischen Konstanten auswirken, so daß dieser Punkt bei der Erörterung der Entropie noch einmal zur Sprache kommen wird.

b) Es liegt eine Kooperation zwischen der Carboxyl- und der Imidazolgruppe vor. Den Mechanismus dieser Kooperation könnte man sich folgendermaßen vorstellen:



Das im Meßbereich vollständig dissoziiert vorliegende Carboxylation unterstützt den Angriff des Imidazols durch allgemeine Basenkatalyse, d.h. es übernimmt ein Proton und erleichtert damit die Bindung des Acylimidazols.



Das übernommene Proton dissoziiert sofort wieder ab, und die freie Carboxylatgruppe erleichtert in einer allgemeinen Basenkatalyse die Hydrolyse des Acylimidazols.

Die relativ geringe Effektivität einer derartigen kooperativen Katalyse liegt u.a. in der verhältnismäßig schwachen Basizität des Carboxylatanions begründet.

Ebenso wie das Tetrapeptid zeigt Imidazol eine positive Abweichung von der nach Brönsted errechneten Geraden. Dieser Befund kann durch Mechanismus (III a,b) erklärt werden.

Die verhältnismäßig starken positiven Abweichungen des Histidins und des Poly - Histidins können auf den geringen Abständen zwischen Imidazol und Carboxyl - Gruppe beruhen, der oben formulierte Mechanismus kann über einen Siebenring verlaufen.

Der negative Einfluß einer Carboxylgruppe auf die katalytische Aktivität von Copoly (His, Asp) und Copoly (His, Glu) bei der Hydrolyse von NPA wird mit elektrostatischen Kräften, die durch die hochgeladenen Polymeren entstehen und sich nachteilig auf die Katalyse auswirken, erklärt [3].

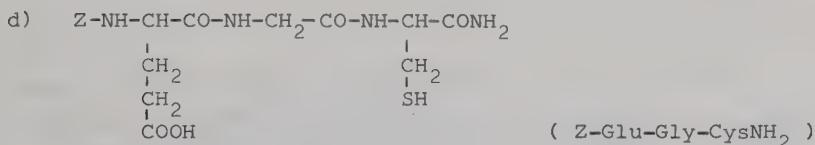
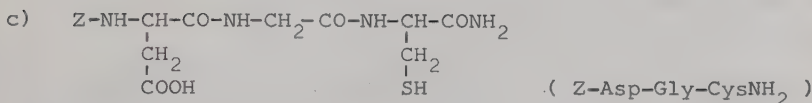
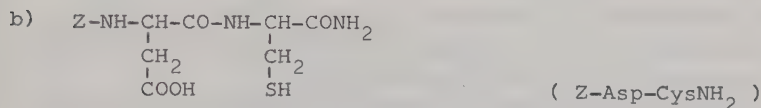
2.3. Katalyse der Esterhydrolyse bei möglichem Zusammenwirken von Carboxyl- und Thiolgruppen.

Vier Verbindungen, die eine SH- und Carboxylgruppe im Mole-

kül enthalten, wurden auf ihre Effektivität bei der Katalyse der NPA - Hydrolyse untersucht:

a) o-Mercaptomethylbenzoesäure in Analogie zu der bereits untersuchten o-Mercaptobenzoesäure [51].

und die folgenden geschützten Peptide, die sich nur im Abstand der Carboxyl- und Thiolgruppe unterscheiden.



Zu a) Für die Katalyse der Esterhydrolyse durch o-Mercaptomethylbenzoesäure wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $81,4 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Dieser Wert ist für eine SH - Verbindung außerordentlich gering; bei einem pK_{SH} dieser Verbindung von 8,8 ist nach Gleichung [14] mit einem Wert von $421 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zu rechnen. Die Abweichung vom berechneten Wert ist nicht erstaunlich, da diese Beziehung nur für einfach gebaute Verbindungen gültig ist, und der -I Effekt des Aromaten unberücksichtigt bleibt.

Für o-Mercaptobenzoesäure wird ein Wert von $60 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ angegeben, die Einführung der CH_2 -Gruppe verstärkt die katalytische Fähigkeit dieser Verbindung leicht.

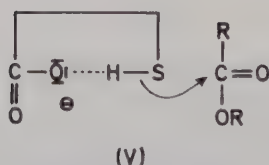
Zu b,c,d)

Bei diesen drei Verbindungen kommen, wie aus der Erhöhung der katalytischen Konstanten für die NPA - Hydrolyse gegenüber den bei einer reinen SH - Katalyse zu erwartenden Werten ersichtlich ist, Einflüsse zur Wirkung, die die Nukleophilie der SH - Gruppe sehr wahrscheinlich durch intramolekulare Wechselwirkungen erhöhen.

Die katalytische Potenz der Verbindung Z-Asp-CysNH₂ und der um ein Gly erweiterten Verbindung Z-Asp-Gly-CysNH₂ ist größenordnungsmäßig gleich und liegt 87 % bzw 80 % über den nach Gleichung [14] errechneten Werten.

Ersetzt man Asp durch Glu so ergibt sich bei der Verbindung Z-Glu-Gly-CysNH₂ eine weitere Steigerung des k₂ Werts auf 155 % des berechneten Werts.

Als möglicher Mechanismus dieser Katalyse bietet sich der zu (IV) analoge Reaktionsverlauf unter Beteiligung des Carboxylations an.

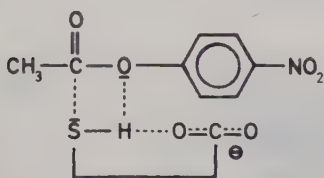


Nach dem vom Carboxylatanion unterstützten nukleophilen Angriff des Thiolatanions bildet sich über ein tetraedrales Zwischenprodukt ein Thioester, der durch Unterstützung des Carboxylatanions über ein tetraedrales Zwischenprodukt in Essigsäure und regenerierten Katalysator zerfällt.

Fridkin und Goren [52] synthetisierten und untersuchten ein Hexapeptid aus dem aktiven Zentrum der Rinder Carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1). Der von diesen Autoren vorgeschlagene Hydrolysemechanismus stellt eine Erweiterung von (V) dar. Da dieser Mechanismus eine Erklärung für die Erhöhung der katalytischen Aktivität beim Übergang von Asparaginsäure zu Glutaminsäure liefern kann, soll er hier kurz

erläutert werden.

Im Gegensatz zu Mechanismus (V) wird bei dem von Fridkin und Goren postulierten Reaktionsablauf eine Vororientierung der Reaktanten angenommen, die durch intermolekulare charge-transfer-Komplex ähnliche Wechselwirkungen zwischen dem Aromaten des NPA und der Carboxylatgruppe zustande kommt.



(VI)

Diese Vororientierung soll gleichzeitige Polarisierung der SH - Bindung durch die Carboxylatgruppe des Katalysators und den Estersauerstoff bewirken. Dieser Mechanismus könnte eine weitere Aktivitätssteigerung gegenüber (V) erklären, da hier

die Thioesterbildung gleichzeitig durch zwei Effekte begünstigt wird: einmal wird durch Basenkatalyse des Carboxylatanions die SH - Bindung polarisiert, zusätzlich kommt es durch die H-Bindung zum O-Atom des Esters zu einer Erhöhung der Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs des Esters.

Zur Beantwortung der Frage, ob die Erhöhung der katalytischen Konstanten beim Übergang von Z-Asp-Gly-CysNH₂ zu Z-Glu-Gly-CysNH₂ auf einer Erleichterung der beschriebenen Vororientierung durch bessere Annäherung der funktionellen Gruppen beruht, können Betrachtungen am Molekülmodell beitragen:

Die nach (VI) geforderte Annäherung der funktionellen Gruppen kann bei allen drei Verbindungen erfolgen. Die Anordnung von SH --- COO⁻ ist bei Verbindung 10 für den nach (VI) postulierten Mechanismus am günstigsten, da hier der optimalste Angriffswinkel des Wasserstoffs vorliegt, und die für notwendige planare Anordnung von SH --- COO⁻ leicht zu verwirklichen ist. Die Abstände zwischen der SH- und Carboxylgruppe des Katalysators und zwischen dem Aromaten und dem Carbonylkohlenstoff des Esters stimmen wie aus Abb (14 a-c) ersichtlich ist, gut überein, so daß aufgrund der sterischen Gegebenheiten bei Verb. 10 die angenommene Vororientierung möglich ist.

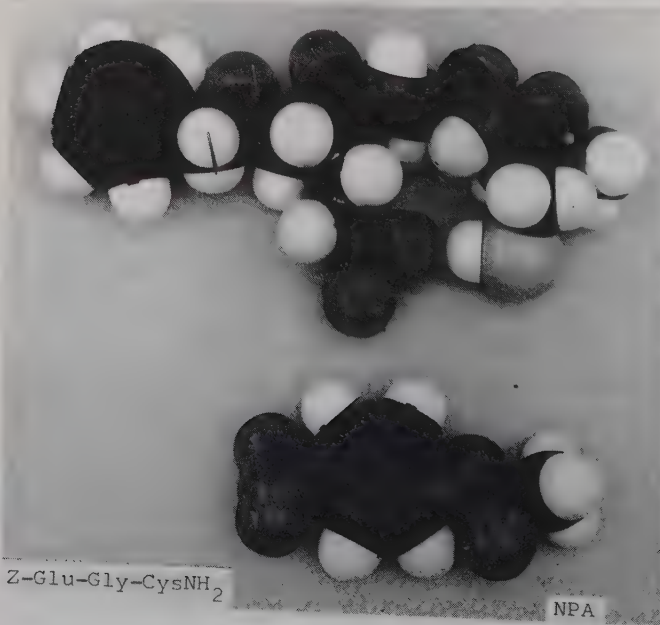
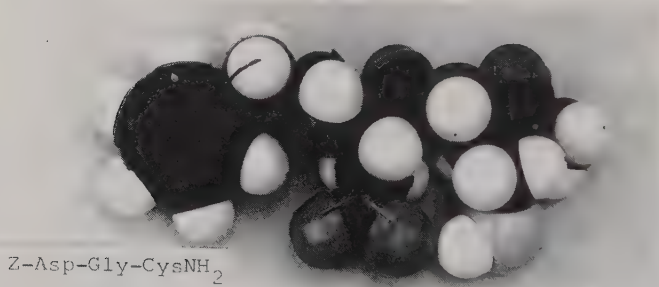


Abb. 14:
Kalottenmod.
der Verb. 8,
9, 10 und
NPA.

Aus Abb. 15 geht hervor, daß es sich bei Z-Asp-CysNH₂, Z-Asp-Gly-CysNH₂ und Z-Glu-Gly-CysNH₂ um die effektivsten in dieser Gruppe synthetisierten Modellverbindungen handelt.

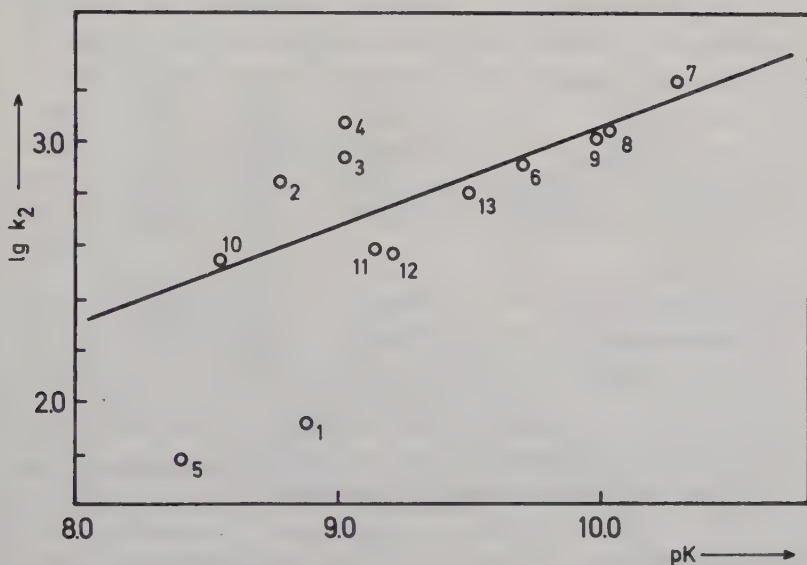


Abb.15:Brønsted - Diagramm der Katalyse der NPA - Hydrolyse durch multifunktionelle SH - Verbindungen; die eingezeichnete Gerade wurde nach Gleichung [14] berechnet. Die Zahlen bezeichnen die nachfolgend aufgeführten Verbindungen.

Tab.22: Vergleich der katalytischen Konstanten der durch COOH/SH - Verbindungen katalysierten Hydrolyse von NPA, sowie pK_{SH} -Werte.

Nr.	Verbindung	k_2	pK_{SH}	Lit
		($l\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$)		
1	o-Mercaptomethylbenzoesäure	81,4	8,88	
2	Z-Asp-CysNH ₂	718,6	8,78	
3	Z-Asp-Gly-CysNH ₂	859,3	9,02	
4	Z-Glu-Gly-CysNH ₂	1221,1	9,03	
5	o-Mercaptobenzoe S.	60,0	8,40	[51]
6	N-Ac-Cys	840	9,70	[46]
7	Mercaptoacetat	1731	10,31	[2,3]
8	Mercaptopropionat	1206	10,03	[3]
9	Ser-Pro-Cys-Ser-Glu-Thr-Tyr	1350	8,30	[52]
10	Cystein	354	8,53	[3,52]
11	Homocystein	380	9,14	[3]
12	Gluthation	383	9,20	[3]
13	cyclo-Asp-Cys	660	9,50	[46]

2.4. Katalyse der Esterhydrolyse bei möglichem Zusammenwirken von Imidazol- und Thiolgruppen.

Die Geschwindigkeit der durch Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂ katalysierten NPA - Hydrolyse ist um 290 % höher als diejenige, die sich nach Brönsted nur durch Summation der katalytischen Beiträge des Imidazolrests und der SH - Gruppe errechnen läßt. Dieses Ergebnis spricht für eine wirkungsvolle Kooperativität zwischen den beiden Gruppen in dieser Verbindung.

Für die kooperative Imidazol/SH - Katalyse wurde von F. Schneider ein Mechanismus vorgeschlagen, der nach dem vom Stickstoff des Imidazols unterstützten nukleophilen Angriff des Schwefels über ein tetraedrales Zwischenprodukt zum Thioester führt. Dieser Thioester wird im nächsten Reaktionsschritt durch den Angriff des Imidazolstickstoff gespalten, und es bildet sich das Acylimidazol, das wie üblich hydrolysiert wird [6].

Die angenommene Umacylierung vom Thioester zum Acetylimidazol wurde durch Reaktionen von Imidazol mit Thioestern nachgewiesen [44,53,54].

Beim 4-[2-Mercaptoäthyl]imidazol und 4-Mercaptoimidazol [6] verläuft dieser Reaktionszyklus aufgrund des Abstands zwischen SH und Imidazol über die im allgemeinen energetisch und sterisch begünstigten Sechs- bzw Fünfringe, was sich in einer hohen nukleophilen Reaktivität niederschlägt. Einen ähnlich günstigen Verlauf kann die Reaktion bei den ebenfalls sehr effektiven Modellsystem aus der Gruppe der Mercaptoalcoyl-Benzimidazole [55] nehmen; auch hier sind die kleinen Ringe durch Fixierung im Molekül praktisch präformiert.

Umso erstaunlicher ist es, daß bei den relativ weiten Abständen zwischen SH-Gruppe und Imidazolrest im untersuchten Pentapeptid zu einer weiteren leichten Erhöhung der nukleophilen Reaktivität gegenüber NPA kommt.

Interpretationen dieses Befundes sind wegen der schlechten Überschaubarkeit in diesem Molekül schwierig. Für die verhältnismäßig hohe Reaktivität, trotz des Verlustes räumlicher Fixierung, können unter anderem folgende Gründe eine Rolle spielen:

- a) Die bisher in die mechanistischen Betrachtungen nicht einbezogene Amidgruppen der Peptidbindungen erfüllen kooperative Funktionen.
- b) Das komplexe Molekül erleichtert eine Vororientierung der Reaktionspartner.
- c) Das Molekül nimmt, stabilisiert durch Wasserstoffbrücken eine Konformation an, die wieder eine ideale Nachbarschaft gewährleistet.

Zu a) Zahlreiche Arbeiten [56,57,58] beschreiben die Beteiligung von Amidgruppen an der intramolekularen Esterhydrolyse, so daß es durchaus vorstellbar ist, daß die

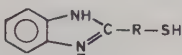
fünf in dem Pentapeptid vorhandenen Amidgruppierungen einen Beitrag zur Katalyse liefern können.

Zu b) Die in Abb. 11 dargestellte Kinetik der durch das Pentapeptid katalysierten Esterhydrolyse zeigt einen Sättigungsverlauf und die Lineweaver - Burck - Auftragung (Abb. 12) ist linear. Diese Befunde können als Hinweis dafür angesehen werden, daß die Katalyse über ein Enzym - Substrat - Komplex analoges Zwischenstadium abläuft, und die Umsetzung dadurch eine weitere Beschleunigung erfährt.

Zu c) Zur Verwirklichung einer direkten Nachbarschaft von SH und Imidazol ergeben sich, da das Pentapeptid durch die zahlreichen CH_2 - Gruppen sehr beweglich ist, viele Möglichkeiten, und man kann auch bei Betrachtung des Kalottenmodells dieser Verbindung keine absolut bevorzugte Orientierung angeben.

Um einen direkten Vergleich zwischen den katalytischen Aktivitäten verschiedener Imidazol/SH - Verbindungen zu ermöglichen, sind in Tab. 23 die katalytischen Konstanten der Verbindungen und ihre pK_{SH} - Werte zusammengefaßt. Abb. 16 zeigt das entsprechende Brönsted - Diagramm.

Nr.	Verbindung	k_2 ($\text{l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	pK_{SH}	Lit
1	Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH ₂	1530	8,77	
2	cyclo His-Cys	474	9,00	[6]
3	Imid-[CH ₂] ₂ -SH	2402	9,80	[6]
4	Imid-CH ₂ -SH	2192	9,50	[6]

Nr.	Verbindung	k_2 ($\text{l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	pK_{SH}	Lit
	<chem>N=C(R)S</chem> 			
5	R = 0	96	9,12	[55]
6	R = 1	1219	8,50	[55]
7	R = 2	1340	9,77	[55]
8	R = 3	1860	9,90	[55]
9	cyclo Cys-His	552	9,00	[59]

Tab.23 Vergleich der katalytischen Konstanten der durch Imidazol/S_H - Verbindungen katalysierten Hydrolyse von NPA sowie pK_{SH} - Werte.

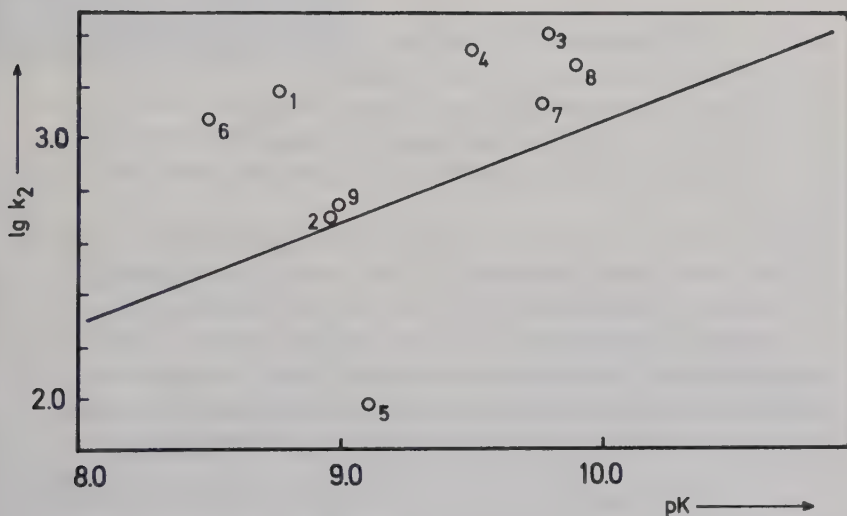


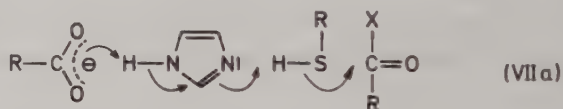
Abb. 16

Abb. 16: Brønsted Diagramm für die in Tab. 23 aufgeführten Verbindungen.

2.5. Katalyse der Esterhydrolyse bei einer möglichen Kooperation von Imidazol, Thiol- und Carboxylgruppe.

Mit der Verbindung Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ konnte untersucht werden, ob mit Einführung der Asparaginsäure eine zusätzliche Carboxylatgruppe die katalytische Effektivität der Imidazol/S_H - Katalyse noch weiter steigern kann.

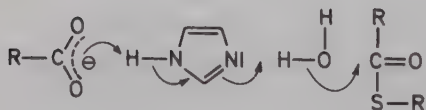
Als ein möglicher Mechanismus unter Beteiligung von Imidazol Carboxyl- und OH - Gruppe wird bei einigen Serinproteasen ein sog. " charge-relay-System " angenommen, das bei Austausch von OH gegen SH folgende Struktur aufweisen sollte:



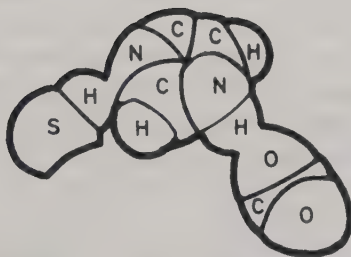
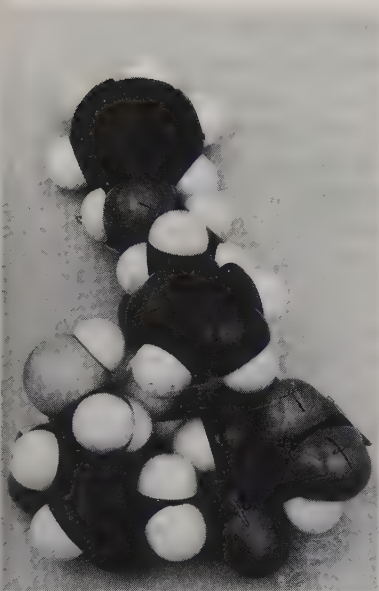
Für das entsprechende OH - System wurden von Rogers und Bruice [60] Modellverbindungen synthetisiert und ihre katalytische Aktivität bei der Esterspaltung untersucht. Durch Einführung der Carboxylatgruppe verdreifacht sich bei diesen Verbindungen die katalytische Konstante der Esterhydrolyse.

Ob eine entsprechende Orientierung der funktionellen Gruppen in dem untersuchten Pentapeptid und damit ein analoger Mechanismus prinzipiell möglich ist, wurde zunächst am Kalottenmodell überprüft. Wie aus Abb.17 ersichtlich ist, können die drei Gruppen sich ohne sterische Hinderung zu der unter (VIIa) geforderten Anordnung arrangieren und eine Ladungsverschiebung in die angenommene Richtung bewirken.

(VIIb)



Nach [60] soll der Deacylierungsschritt unter Beteiligung eines Wassermoleküls wieder über einen analogen Ladungsübertragungsmechanismus verlaufen.



SH Imidazol COO⁻

Abb. 17: Kalottenmodell¹ des Pentapeptids Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ bei optimaler Wechselwirkung der Carboxyl-, Thiol- und Imidazolrestes.

Der k_2 - Wert der durch Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ katalysierten NPA - Hydrolyse zeigt erwartungsgemäß eine sehr stark ausgeprägte pH - Abhängigkeit. Bei pH 7,0 wurde ein k_2 - Wert von 4920 l mol⁻¹min⁻¹ ermittelt, für pH 7,5 ergibt sich für k_2 2534 l mol⁻¹min⁻¹. Die Werte schwanken damit zwischen dem 4 bzw. 8 fachen Wert der nach Brönsted berechneten Größe. Für die folgenden Betrachtungen wird die Konstante bei 7,5 zu Grunde gelegt.

Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ weist gegenüber den berechneten k_2 - Werten eine 4,1 fache Steigerung auf. Bei der analogen Verbindung ohne Asparaginsäure (Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂) ergibt sich ein Wert von 3,9. Aus dem Vergleich der Werte ist ersichtlich, daß das zusätzliche Carboxylatanion nur einen geringen Einfluß auf die katalytischen Eigenschaften

besitzt. Der Befund steht im Widerspruch zu den Untersuchungen am COOH/Imidazol/OH - System [60], bei denen die Einführung der Carboxylatgruppe im allgemeinen eine deutliche Steigerung der katalytischen Konstanten bewirkt. Die Unterschiede kann man durch die chemische Verschiedenheit von Schwefel und Sauerstoff erklären. Die SH - Bindung ist von vorneherein stärker polarisiert als die OH - Bindung, eine für den nukleophilen Angriff optimale Polarisierung erfolgt daher relativ leicht, d.h. schon durch Imidazol allein, und ein weiterer Effekt durch die Carboxylatgruppe, der bei der OH - Bindung durchaus noch eine Rolle spielt, wirkt sich bei der SH - Gruppe scheinbar bereits nicht mehr aus.

Bisher ist keine Modellverbindung zur kooperativen SH - Katalyse beschrieben, bei der der Quotient aus den gemessenen und berechneten k_2 - Werten den Faktor 4 wesentlich übersteigt.

Für Cys- γ Abu-His- γ Abu-Asp wurde ein Wert von 3,6 und für Ac-Cys-His ein Wert von 2,2 ermittelt [59].

Eine weitere Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten für die NPA - Hydrolyse kann offensichtlich nicht mehr durch eine Steigerung der Reaktivität der SH - Gruppe über kooperative Effekte erreicht werden.

2.6. Vergleich der Effektivität der durch Imidazol/COOH/OH und Imidazol/COOH/SH katalysierten NPA - Hydrolyse.

Da zahlreiche Modellstudien zur kooperativen Imidazol/COOH/OH Katalyse vorliegen, sollen einige Werte mit den k_2 - Werten entsprechender SH - Verbindungen verglichen werden.

Verbindung	k_2 ($\text{lmol}^{-1}\text{min}^{-1}$) der NPA-Hydr.	Lit.
Ser- γ Abu-His- γ Abu-Asp	147	[61]
Cys- γ Abu-His- γ Abu-Asp	1940*	[59]
Ser-His-Asp	45	[61]
Cys-His-Asp	1226*	[59]
His-Ala-Glu-Gly-Ser	87	[62]
His-Ala-Asp-Gly-Ser	210	[62]
His-Ala-Asp-Gly-CysNH ₂	2524*	
His-Ala-Gly-Ser	15	[62]
His-Ala-Gly-Gly-CysNH ₂	1221*	

* Werte bei pH 7,5 und 25°C.

Tab. 24: Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten 2.Ordnung der durch Imidazol/COOH/OH und Imidazol/COOH/SH Verbindungen katalysierte NPA - Hydrolyse.

Die Differenzen in der Größenordnung von bis zu zwei Zehnerpotenzen ergeben sich hauptsächlich aus der bereits erörterten größeren nukleophilen Reaktivität des Schwefels; außerdem ist eine unterschiedliche Auswirkung kooperativer Effekte denkbar.

3. Vergleich der spontanen und katalysierten NPA und Boc-AlaONp - Hydrolyse.

Bei den bisher durchgeführten Untersuchungen wurde nur der Einfluß bestimmter struktureller Variationen der Katalysatoren auf die NPA - Hydrolyse berücksichtigt, zusätzlich wurde aber bei allen Verbindungen noch die katalytische Wirkung auf die Hydrolyse eines zweiten Esters, nämlich Boc-AlaONp gemessen.

In Tab. 8 sind die pH unabhängigen Hydrolysekonstanten beider Ester aufgeführt; vergleicht man die ermittelten Werte, so wird die Boc-AlaONp - Hydrolyse gegenüber der NPA Hydrolyse durch die verschiedenen Verbindungen um folgenden Faktor beschleunigt:

Verbindung	Faktor
7 o-Mercaptomethylbenzoesäure	12,3
8 Z-Asp-CysNH ₂	9,1
9 Z-Asp-Gly-CysNH ₂	12,3
10 Z-Glu-Gly-CysNH ₂	10,7
11 Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH ₂	10,3
12 Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH ₂	9,7
13 Z-His-Ala-Asp-GlyOCH ₃	3,0

Tab.25: Vergleich der unterschiedlichen Wirkung der untersuchten Verbindungen auf die NPA - und Boc-AlaONp Hydrolyse.

Für die Verbindungen 7 - 12 kann man etwa einen Faktor von $10,7 \pm 1,6$ angeben. Bei Verbindung 13 ergibt sich nur ein Faktor von 3.

Bevor diese Ergebnisse weiter diskutiert werden, sollen die unterschiedlichen Strukturmerkmale sowie die kinetischen und thermodynamischen Parameter der Spontanhydrolysen beider Ester verglichen werden.

Die Alkohol-komponente kann bei diesem Vergleich vernachlässigt werden, da es sich in beiden Fällen um die gleiche, gute Abgangsgruppe p-Nitrophenol handelt. Die Säuregruppen (Essigsäure und Boc-Ala) unterscheiden sich in der Säurestärke; der pK - Wert der Essigsäure liegt bei 4,65, Boc-Ala weist einen pK von 3,54 auf.

Aus diesen unterschiedlichen pK - Werten resultiert bei Boc-AlaONp eine stärkere Polarisierung der Carbonylfunktion als bei NPA. Boc-AlaONp ist daher für einen nukleophilen Angriff der aktiviertere Ester.

Um zu entscheiden, ob diese gesteigerte Reaktivität bereits den Faktor 10 beinhaltet, werden zunächst die Geschwindigkeiten der Spontanhydrolysen miteinander verglichen.

Bei 25° C und pH 7,00 beträgt die Spontanhydrolyse von NPA $1,68 \times 10^{-3}$ von Boc-AlaONp $4,29 \times 10^{-3}$, die Boc-AlaONp-Hydrolyse ist danach um das 2,6 fache beschleunigt.

Vergleicht man die in Tab. 14 aufgeführten thermodynamischen Größen der Spontanhydrolyse, so ist die Aktivierungsenergie und -enthalpie der Aminosäureesterhydrolyse um 26% gesenkt; die freie Aktivierungsenthalpie ist ebenfalls herabgesetzt, ein Zeichen für gesteigerte Affinität der Reaktionspartner; die Aktivierungsentropie liegt doppelt so hoch wie für NPA.

Geht man von der Spontanhydrolyse, bei der OH^- der Reaktionspartner des Esters ist, zu den untersuchten Katalysatoren über, so ist es leicht einzusehen, daß es auch von der Nukleophilie des angreifenden Agens abhängig ist, wie stark sich die gesteigerte Polarisierung der Estergruppe auswirkt. Bei Verbindung 13, in der Stickstoff das angreifende Nukleophil

ist, wurde ein Faktor von 3 ermittelt, und es ist möglich, daß die Steigerung bei Verbindung 7 - 12 auf den Faktor 10 ausschließlich auf der stark ausgeprägten Nukleophilie des Schwefels beruht. In wieweit sich zusätzliche Entropieeffekte auswirken, soll bei der Betrachtung der thermodynamischen Konstanten diskutiert werden.

Da bei Modelluntersuchungen in der Literatur Boc-AlaONp bisher nicht als Estersubstrat verwendet wurde, liegen keine Vergleichswerte vor, die eine Aussage über die Effektivität der synthetisierten Modelle machen können.

Die durch verschiedene SH - Enzyme katalysierte Hydrolyse geschützter Aminosäure-p-Nitrophenylester wurde untersucht, [63,64], und für die k_{cat} - Werte der enzymatischen Hydrolyse von Z-AlaONp ergaben sich für die verschiedenen Enzyme folgende Werte:

Katalyse durch Streptococcen-Protease	$k_{\text{cat}} = 7080 \text{ min}^{-1}$
Katalyse durch Papain	$k_{\text{cat}} = 1638 \text{ min}^{-1}$
Katalyse durch Ficin	$k_{\text{cat}} = 1860 \text{ min}^{-1}$

Die durch Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂ und durch Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ katalysierte Hydrolyse von Boc-AlaONp liegt mit k_2 - Werten von $15864 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und $24612 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ weit über den Umsatzgeschwindigkeiten der enzymatisch katalysierten Reaktionen. Ein direkter Vergleich der Werte ist nicht möglich, da sich die Aminosäureestersubstrate in der Carboxylschutzgruppe unterscheiden, und es denkbar ist, daß die Umsatzgeschwindigkeiten des, für die enzymatische Reaktion sowieso schon ungünstigen, Substrats durch eine weitere Phenylgruppe im Molekül noch herabgesetzt werden.

4. pH - Abhängigkeit der k_2 - Werte.

Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ zeigt eine sehr starke pH - Abhängigkeit der k_2 - Werte für die NPA- und Boc-AlaONp - Hydrolyse. Die im pH - Bereich von 7,00 ermittelte Konstante von $4920 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ sinkt bei Messungen bei pH 8,5 auf einen

Wert von $1500 \cdot \text{lmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ab, ebenso zeigt der k_2 - Wert der Reaktion von NPA und Boc-AlaONp mit Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂ eine, wenn auch wesentlich schwächer ausgeprägte, pH - Abhängigkeit.

Die zur kooperativen SH/COOH - Katalyse untersuchten Verbindungen besitzen nahezu konstante k_2 - Werte, nur bei Z-Glu-Gly-CysNH₂, der katalytisch wirksamsten Verbindung dieser Gruppe, tritt bei pH - Werten über 8,00 eine leichte Abnahme auf.

Betrachtet man diese Befunde, so fällt ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der pH Abhängigkeit der k_2 - Werte und der katalytischen Aktivität der Verbindungen einerseits, und dem pK - Wert der katalytisch aktiven Gruppe andererseits auf.

Ähnliche pH - Abhängigkeiten wurden bei zahlreichen Untersuchungen in der Literatur beobachtet [2,6,46], und es sind verschieden Ansätze zu ihrer Interpretation gemacht worden.

Da bei sinkendem pH - Wert der Anteil an undissoziierter SH - Gruppe zunimmt, trat als erstes die Vermutung auf, daß auch die undissoziierte SH - Gruppe katalytisch wirksam ist [46,65]. Diese Vermutung konnte aber durch Berechnung der k_2 - Werte unter Berücksichtigung von RSH und Vergleich der berechneten mit den gefundenen Werten ausgeschlossen werden.

In Abb. 7 ergeben sich bei der logarithmischen Auftragung der k_2 - Werte gegen den pH - Wert Geraden mit Knickpunkten. Für Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ liegt der Knickpunkt für die Umsetzung mit NPA und Boc-AlaONp bei einem pH - Wert von 8,05, das ist genau der Wert, der sich aus dem Quotienten $(\text{pK}_{\text{SH}} + \text{pK}_{\text{Imid}}) / 2$ ergibt. Gleiche Ergebnisse in der Literatur werden folgendermaßen interpretiert[67]:

Am Knickpunkt ist die Konzentration der katalytisch aktiven Form $\text{Im}^+\text{H} - \text{S}^-$ am größten, bei sinkendem pH - Wert nimmt

die Konzentration an Imidazolbase ab, die Konzentration an undissoziiertem SH, also der inaktiven Spezies $\text{Im}^+\text{H} - \text{SH}$ zu; bei steigendem pH - Wert liegt im Extremfall nur noch $\text{Im} - \text{S}^-$ vor. In folge der Kooperativität zwischen SH und Imidazol ist aber bei pH - Werten unter 8,05 die SH - Gruppe in einem stärkeren Maße reaktiv, als es aufgrund ihres pK - Wertes zu erwarten ist. Das bedeutet, die k_2' - Werte werden unterhalb dieses pH - Werts durch ein zu kleines α dividiert, was zu einem Anstieg der k_2 - Werte führt. Dieser Effekt sollte sich umso stärker bemerkbar machen, je ausgeprägter die Kooperativität ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Erklärung. Es ergibt sich ein klarer Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Kooperativität und der pH - Abhängigkeit der k_2 - Werte: liegen die pH - Werte der Messungen unterhalb des Quotienten

$$\frac{\text{pK}_{\text{SH}} + \text{pK}_{\text{einer weiteren kooperativ wirksamen Gruppe}}}{2}$$

2

werden konstante, pH - unabhängige k_2 - Werte gefunden, wie die Messungen der Esterhydrolysen mit SH/COOH - Katalysatoren bestätigen.

Diese Feststellung erlaubt umgekehrt den Schluß, daß bei starker pH - Abhängigkeit der k_2 - Werte eine zweite dissoziierbare Gruppe mit einem entsprechenden pK - Wert z.B. Imidazol maßgeblich an der Katalyse beteiligt sein muß. Dieser Befund ist für die Besprechung der trifunktionellen Modellverbindung Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ von Interesse.

5. Diskussion der aus dem Lindley - Diagramm ermittelten pK - Werte.

Beim Vergleich der photometrischen und der kinetischen, über die pH Abhängigkeit der Katalyse der Esterhydrolyse ermittelten pK_{SH} - Werte ergeben sich zum Teil starke Abweichungen, wobei die kinetischen pK - Werte immer niedriger liegen als die photometrischen.

Verbindung	7	8	9	10	11	12
pK_{SH} (phot.)	8,88	8,76	9,02	9,03	8,77	9,28
pK_{SH} (kinet.)	8,76	8,52	8,46	8,55	8,11	8,05

Tab.26: Vergleich der photometrisch nach Benesh [24] ermittelten und der kinetischen aus dem Lindley - Diagrammen [26,27] entnommenen pK - Werte.

Andere vergleichende Untersuchungen [48] zwischen pK_{SH} kin und pK_{SH} phot. ergeben ähnliche Differenzen. Diese Ergebnisse muß man vorallem bei der kinetischen pK - Wertbestimmung reaktiver Gruppen in Enzymen berücksichtigen.

In den kinetischen pK - Werten kommen entweder kooperative Effekte mit anderen funktionellen Gruppen zum Ausdruck oder alle sonst möglichen Einflüsse der Umgebung der dissoziablen Gruppe; durch Erhöhung der Polarisierung der katalytisch wirksamen Gruppe kann diese in einem stärkeren Maße dissoziiert sein als es ihrem tatsächlichen pK - Wert entspricht. Mit Einschränkung kann man sagen, daß die Größe der Differenz in den pK - Werten einen Hinweis auf das Ausmaß der Kooperativität geben kann. Andererseits sollte man bei Verbindungen mit stark ausgeprägter Kooperativität theoretisch keine linearen Lindley - Diagramme mehr erhalten. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden bei der graphischen Darstellung

die bei den niedrigen pH - Werte (hohen H^+ - Konzentrationen) weiter auseinander liegenden Punkte stärker berücksichtigt, als die dicht zusammenfallenden Meßwerte bei niedrigen H^+ - Konzentrationen, so daß einige Kurven linearisiert wurden, die streng genommen nicht mehr linear sind. Aus Tab. 10 wird deutlich, daß die Differenzen zwischen den photometrischen und kinetischen pK - Werten umso größer sind, je stärker sich auch die gefundenen und nach Brönsted berechneten katalytischen Konstanten unterscheiden.

Die aus der Temperaturabhängigkeit der kinetischen pK - Werte ermittelten Dissoziationswärmen der SH - Gruppen müssen unter gleichem Vorbehalt betrachtet werden; zusätzlich ergibt sich bei der Ermittlung dieser Werte noch die Schwierigkeit, daß bei nur drei Punkten im $pK/1/T$ - Diagramm nicht sicher entschieden werden kann, ob der Verlauf in allen Fällen linear ist.

6. Diskussion der thermodynamischen Größen.

Die Berechnung der Änderungen der freien Energie und Entropie aus der dem Arrheniusdiagramm entnommenen Aktivierungsenergien ist in Anbetracht der Komplexität der untersuchten Reaktionen nicht unproblematisch; ihr Aussagewert sollte daher nicht überbewertet werden. Die in Tab. 14 aufgeführten thermodynamischen Größen sollen daher nur einen zusätzlichen Beitrag zur Diskussion der Reaktionsmechanismen und eventuell weitere Informationen zur Frage der Kooperativität der Katalyse liefern.

Es ist zunächst zu prüfen, auf welche der ermittelten Größen (Tab. 14) sich mögliche kooperative Effekte auswirken sollten. Wie zuvor erläutert bewirkt die kooperative Katalyse durch Steigerung der Nukleophilie eine erhöhte Reaktivität der katalytisch aktiven Gruppen. Von Seiten des Esters führt eine erhöhte Polarisierung der Carbonylgruppe beim Übergang von NPA zu Boc-AlaONp zu stärkerer Reaktionsbereitschaft. Da die Änderung der freien Enthalpie (ΔG) ein Maß für die chemische Triebkraft (=Affinität) einer Reaktion ist, sollte eine Erhöhung der Reaktivität der Reaktionspartner sich in den ΔG - Werten abzeichnen. Die berechneten ΔG - Werte sollen unter diesem Aspekt analysiert werden.

1) Thermodynamische Parameter der katalysierte NPA - Hydrolyse.

Aus Tab. 14 ist ersichtlich, daß die Reaktion von Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ mit NPA, die die höchste Geschwindigkeitskonstante aufweist auch gleichzeitig die niedrigste Aktivierungsenthalpie und größte Aktivierungsentropie besitzt. Bis auf eine Umkehr der Reihenfolge der Verbindungen Z-Asp-Gly-CysNH₂ und Z-Glu-Gly-CysNH₂ zeigen die Abnahmen der Aktivierungsenthalpie und die Entropiezunahme die gleiche Tendenz, wie die Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung. Die für die durch Imidazol und Cystein katalysierte Hydrolyse von NPA ermittelten $\Delta H^\ddagger$ - Werte [59] liegen bei 7,9 und 7,4 kcal/Mol; durch die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen wird die Geschwindigkeit der NPA - Hydrolyse in einigen Fällen zwar auf ein Vielfaches erhöht, die Aktivierungsenergie aber nicht drastisch erniedrigt. In einigen Fällen ist eine Betrachtung der Entropieänderung hilfreich. Da die Entropieänderungen von zahlreichen Faktoren beeinflußt werden, wie z. B. durch Ladungsänderung bei Bildung des Übergangskomplexes und auch Lösungsmittel abhängig sind, beinhalten die ermittelten Werte eine Summe aller möglichen den Ordnungszustand im System ändernden Faktoren, die nicht einzeln aufgeschlüsselt werden können.

Betrachte man die Verbindungen der Reihe Z-Asp-CysNH₂ (8), Z-Asp-Gly-CysNH₂ (9) und Z-Glu-Gly-CysNH₂ (10) unter diesem Gesichtspunkt, so fällt bei Verbindung 8 und 10 eine geringe negative Aktivierungsentropie auf. Dieser Befund kann als eine Stütze für den unter (VI) formulierten Reaktionsmechanismus gewertet werden; in dem Sinne, daß bei Verbindung 8 und 10 die postulierte Vororientierung der reaktiven Gruppen möglich ist, und die Reaktionsgeschwindigkeit durch diesen Effekt erhöht wird. Die Aktivierungsentropie steigt bei Verbindung 9 durch Einführen eines Glycins und der damit verbundenen Vergrößerung der Entfernung der SH - und COOH - Gruppe von 8,52 bei Verbindung 8 auf 27,2 bei Verbindung 9 an. Offensichtlich ist der Abstand für die optimale Vororientierung der aktiven Gruppen zu groß geworden.

Mit den Verbindungen 9,11,12 und 13 findet man in etwa gleiche Entropieänderungen, die in der selben Größenordnung der für die durch Cystein katalysierte NPA - Hydrolyse ermittelten Werte liegen.

Einen in Hinblick auf die katalytische Effektivität niedrigen Entropiewert weist o-Mercaptomethylbenzoesäure auf. Betrachtet man aber die ΔG und ΔH - Werte dieser Verbindung, so überrascht die geringe Reaktivität nicht, da der hohe ΔG - Wert, die durch den Aromaten bewirkte Senkung der Nukleophilie des Schwefels und damit der verminderten Triebkraft der Reaktion ausdrückt.

Um die Differenzen der ΔG - Werte der Verbindungen richtig bewerten zu können, muß vorausgeschickt werden, daß sich eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit bei der Berechnung von ΔG nur in einer ca 2,5 %igen Abnahme des ΔG - Wertes bemerkbar macht (z.B. von 17,45 auf 17,04).

Betrachtet man die ΔG - Werte als Ausdruck der Affinität der Reaktionspartner zueinander, so kann man, da bei allen Verbindungen NPA als Estersubstrat diente, aus den ermittelten Werten Rückschlüsse auf die Nukleophilie des Katalysators ziehen.

Auf Grund der fast gleichen ΔG - Werte für Verbindung 11 und 12 kann man in Hinblick auf den Mechanismus vermuten, daß die β -Carboxylgruppe der Asparaginsäure keine weitere Polarisierung der SH - Gruppe bewirkt, also kaum kooperativ wirksam ist.

Zu einer weiteren Gruppe lassen sich die Verbindungen 8, 9 und 10 zusammenfassen. Die ΔG - Werte der drei Verbindungen sind praktisch identisch, die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten scheinen ausschließlich auf Entropieeffekten zu beruhen.

In dem ΔG -Wert für Verbindung 13 drückt sich die im Vergleich mit der SH - Verbindungen verminderte Nukleophilie des Stickstoffs aus; ebenso ist der ΔG - Wert für Verbindung 7 ein direktes Maß für die zuvor beschriebene Senkung der Nukleophilie durch die Nachbarstellung der Aromaten.

2) Thermodynamische Parameter der katalysierten Boc-AlaONp Hydrolyse.

Ein Vergleich der thermodynamischen Parameter der Reaktionen der verschiedenen Katalysatoren mit Boc-AlaONp und mit NPA als Estersubstrate erlaubt eventuell weitere Rückschlüsse auf die vorliegenden Reaktionsmechanismen; es sollen daher nur die Fälle verglichen werden, bei denen ein Wechsel des Estersubstrats zu starken Unterschieden in den thermodynamischen Parameter führen.

Der Faktor 10, um den die Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Boc-AlaONp - Hydrolyse größer ist als die der katalysierten NPA - Hydrolyse, kommt in den ΔG - Werten der Reaktionen zum Ausdruck. Bei Anordnung der Verbindungen nach steigenden ΔG - Werten ergibt sich bis auf den Austausch von 11 und 12 die gleiche Reihenfolge wie bei den zuvor betrachteten NPA - Hydrolysen; auch die Differenzen untereinander sind in etwa identisch.

Die Erniedrigung der ΔG - Werte beruht offensichtlich ausschließlich auf der Erhöhung der Reaktivität des Esters.

Betrachtet man die Änderung der Entropiewerte so fällt die starke Abnahme der Entropieänderung bei Verbindung 12 auf; im Vergleich zu der durch Verbindung 12 katalysierten NPA - hydrolyse nimmt der Wert um 87 % ab. Zwischen der Säureamidbindung des Substrats (Boc-Rest) und der Carboxylgruppe des Katalysators sind Wechselwirkungen vorstellbar, die durch Vororientierung der Reaktanten den beobachteten starken Entropieabfall bewirken könnten.

Bei den strukturell verwandten Verbindungen 8,9 und 10 ergeben sich bei Vergleich der Entropieänderungen keine neuen Aspekte.

Bei Anordnung der Katalysatoren nach steigenden ΔH - Werten zeigt sich für die Katalyse der Boc-AlaONp - Hydrolyse eine wesentlich andere Reihenfolge als für die Katalyse der NPA Hydrolyse. Z-Asp-Gly-CysNH₂ weist den bei weiten niedrigsten Wert auf, während für die strukturell analoge Verbindung Z-Glu-Gly-CysNH₂ der höchste ΔH - Wert gefunden wird.

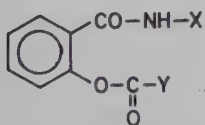
Zusammenfassend folgt aus der Betrachtung der thermodynamischen Parameter, daß die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der katalysierten Reaktion und damit der Effektivität der Katalyse entweder über die Änderung der freien Aktivierungsenthalpie, in der sich eine durch Kooperativität gesteigerte Affinität von Katalysator und Substrat ausdrückt, oder über eine Änderung der Aktivierungsentropie, die eine Vororientierung der Reaktanten anzeigt, erfolgen kann.

7. Intramolekulare Esterhydrolyse

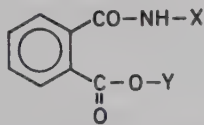
Die häufigste in den Enzymen auftretende funktionelle Gruppe ist die Amidbindung in Form der Peptidbindung; trotzdem ist ihre mögliche Rolle als direkter Partner eines katalytischen Prozesses bisher kaum in die Diskussion um die Prinzipien der Esterkatalyse einbezogen worden.

Die zu diesem Fragenkomplex durchgeführten Experimente dieser Arbeit beziehen sich auf die durch eine ideal benachbarte Amidgruppe katalysierte Esterhydrolyse in Modellsubstanzen, die die katalytisch aktive Gruppe und die zu spaltende Esterbindung im selben Molekül, in einer für den Ablauf der Katalyse möglichst günstigen Position zueinander enthalten. Die Verbindungen simulieren damit das Verhältnis eines Enzym - Substrat - Komplexes, in welchem sich alle Reaktanten in optimaler Orientierung befinden.

Wie aus zahlreichen Arbeiten bekannt ist [66,67,56] führt die intramolekulare Katalyse gegenüber der intermolekularen zu zum Teil erheblichen Steigerungen der Effektivität der Katalyse. So stellten z.B. Behme und Cordes [56] fest, daß die durch die benachbarte Amidgruppe intramolekular katalysierte Esterhydrolyse im Acetylsalicylsäureamid im Vergleich zu der durch Acetamid katalysierten intermolekularen Katalyse des p-Nitrophenylacetats unter gleichen Reaktionsbedingungen um den Faktor 60 000 beschleunigt wird. Die zunächst an Salicylsäure durchgeführten Überlegungen wurden auf andere vergleichbare Verbindungstypen ausgedehnt, die sich durch folgende allgemeine Form darstellen lassen:



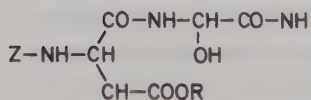
(a)



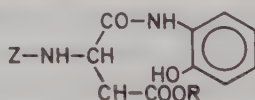
(b)

Die Substituenten X und Y wurden variiert und ihr Einfluß auf die Hydrolysegeschwindigkeit der Estergruppierung untersucht; dabei wurde zunächst auf die Einführung weiterer potentiell katalytisch aktiver Gruppen mit X und Y verzichtet. Wurde mit X eine weiter funktionelle Gruppe, wie z.B. eine OH - Gruppe eingeführt, so wird eine weitere Beschleunigung der Esterhydrolyse beobachtet.

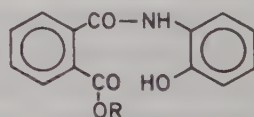
Beschleunigungen von Esterhydrolysen durch OH - Gruppen an Peptidbindungen wurden zum ersten Mal durch Bernhard et al beschrieben [66,67]. Diese Autoren stellten eine 10^7 fache Beschleunigung der Verseifungsgeschwindigkeit der Estergruppe im Z-Asp(βBenzylester)-α-Serinamid im Vergleich mit derjenigen von Propionsäurebenzylester unter gleichen Reaktionsbedingungen fest. Mit dem Ziel einer fortschreitenden Fixierung der miteinander in Wechselwirkung tretenden Gruppen wurden von den selben Autoren die nachfolgend aufgeführten Verbindungen synthetisiert, bei denen eine zunehmende Labilität der Estergruppe beobachtet wurde.



(c)



(d)



(e)

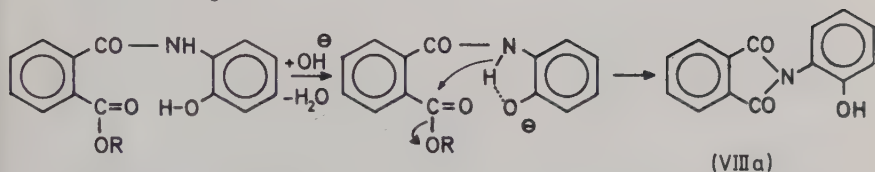
Mechanismus der Esterhydrolyse

Wie spektroskopisch nachgewiesen werden konnte [56,57], verläuft die Esterhydrolyse der letztgenannten Verbindungen unter Beteiligung einer ideal benachbarten Säureamidgruppe und der Hydroxylgruppe bei intermediärer Bildung cyclischer Imide, wobei eine allgemeine Säure - oder Basenkatalyse möglich ist. Für Verbindung e) ergibt sich daraus folgendes

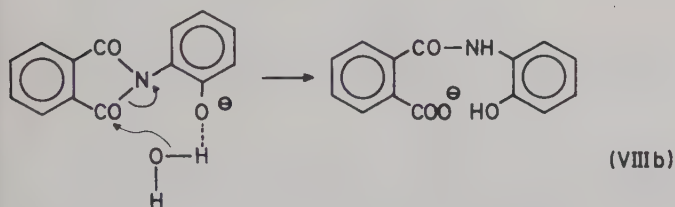
Reaktionsschema:

1) Allgemeine Basenkatalyse.

a) Imidbildung:

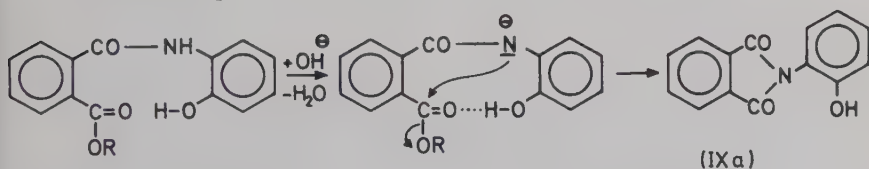


b) Imidhydrolyse:

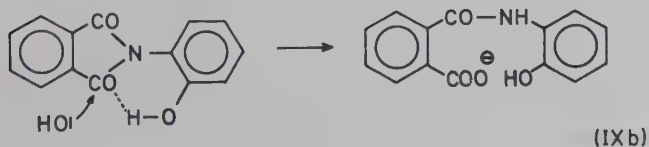


2) Allgemeine Säurekatalyse.

a) Imidbildung:



b) Imidhydrolyse:



Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist in allen Fällen die Imidhydrolyse.

Austausch der OH - Gruppe gegen eine SH - Gruppe.

In Hinblick auf den unterschiedlichen Mechanismus der Serin- und SH - Proteasen war ein Austausch der OH - Gruppe gegen eine SH - Gruppe und die anschließende Messung der Esterhydrolyse von besonderem Interesse.

Ein entsprechender Austausch wurde bereits an der Hydrolase Subtilisin durchgeführt [68,69,70,71]. . Der Austausch der OH - Gruppe des Subtilisins gegen eine SH - Gruppe hatte zur Folge, daß die Geschwindigkeit der PNA - Hydrolyse durch das Thiolenzym auf 30% des Werts, der bei normaler Subtilisinkatalyse erhalten wird, abfällt und daß das Thiolenzym keine nennenswerten Aktivitäten gegenüber einfachen nicht aktivierten Estern und Peptiden, den physiologischen Substraten des Enzyms, mehr aufweist.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen hat zunächst die Frage interessiert, ob die Esterhydrolyse nach Austausch einer OH - gegen eine SH - Gruppe nach dem gleichen Mechanismus verläuft. Die in Tab. 1 aufgeführten Substanzen 1-6 enthalten die reaktiven Gruppen COOR---CO-NH---SH in unterschiedlichem Abstand bei unterschiedlichem Fixierungsgrad.

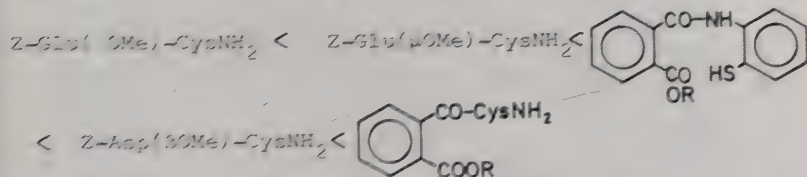
Verb. 1 ist die zu e) analoge SH - Verbindung. In Verbindung 2 wird unter Beibehaltung der Fixierung der COOR---CO-NH - Gruppierung die Beweglichkeit der SH - Gruppe erhöht. In der zu c) analogen Verbindung 3 ist die Flexibilität aller Gruppen gesteigert und dieser Effekt wird durch das Einführen einer weiteren CH₂ - Gruppe noch erhöht. (Verb. 5 und Verb. 6)

Räumliche Struktur und kinetischen Konstanten

Da der SH - Gehalt bei allen Verbindungen über einem Wert von 90% lag, und die pK - Werte soweit sie ermittelt werden konnten, nicht stark differieren, können die Hydrolysegeschwindigkeiten der Ester der einzelnen Verbindungen

schon auf der Grundlage der k_D - Werte miteinander verglichen werden.

Die Hydrolysegeschwindigkeit nimmt in folgender Reihe zu:



Im Gegensatz zu den Ergebnissen der analogen OH - Verbindungen ergibt sich bei den untersuchten SH - Verbindungen keine kontinuierliche Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit mit zunehmender Fixierung der an der Umsetzung beteiligten Gruppen.

Nach Methylierung der SH - Gruppe mit Diazomethan fielen die Hydrolysegeschwindigkeiten der Ester erheblich ab, die SH - Gruppe war also angeblich an der Katalyse beteiligt sein.

Nimmt man einen zu (VIII) analogen Ablauf der Reaktion an, so ist der erste Schritt der Hydrolyse die Imidbildung. Damit dieser Schritt leicht erfolgt, müssen S^- , CO-NH, und COOR in Wechselwirkung treten.

An den Kalottenmodellen dieser Verbindungen wurde überprüft, ob die Annäherung dieser drei Gruppen bei allen Verbindungen gleich günstig ablaufen kann.

Betrachtet man die Modelle der Verbindungen in der Reihenfolge ihrer Hydrolyseaktivität, so scheint allgemein ein Kompromiß zwischen maximaler Fixierung und gegenseitiger Behinderung der Gruppen vorzuliegen.

Auf Grund des größeren Atomradius des Schwefels im Vergleich zum Sauerstoff führt die starre Fixierung in Verbindung 1 eher zu gegenseitiger Behinderung und Abstoßung als zu einer gesteigerten Reaktivität. Um eine günstige Anordnung der Gruppen zu erreichen, müssen die Aromaten stark aus der

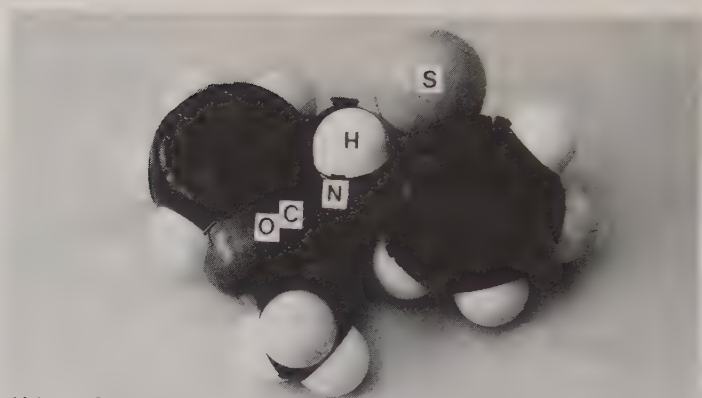


Abb. 18



Abb. 19



Abb. 20

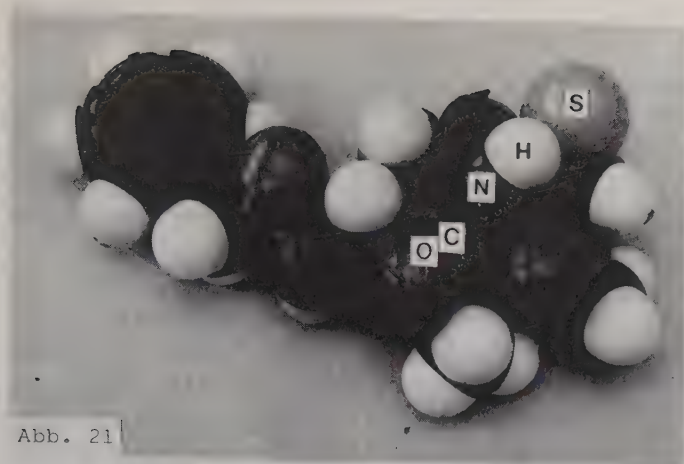


Abb. 21

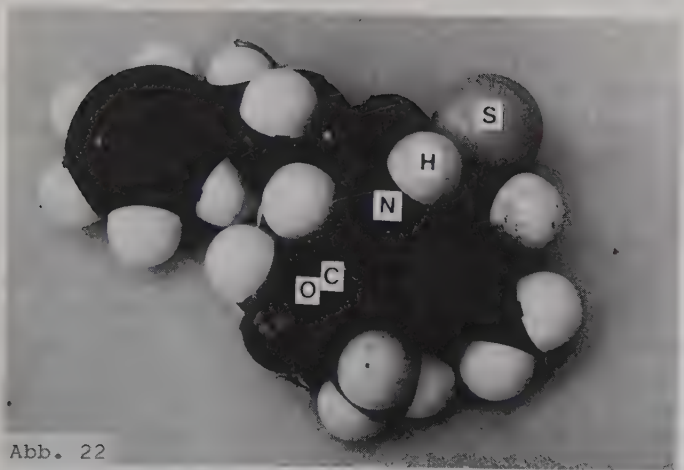


Abb. 22

Abb. 18 - 22: Kalottenmodelle der zur intramolekularen Katalyse der Esterhydrolyse untersuchten Verbindungen.

Abb. 18: N(o-Carbomethoxy-Benzoyl)-o-Aminothiophenol

Abb. 19: Phthalylmonomethylester-Cysteinamid

Abb. 20: Z-Asparagyl(BOMe)-Cysteinamid

Abb. 21: Z-Glutamyl(γ OMe)- α Cysteinamid

Abb. 22: Z-Glutamyl(α OMe)- γ Cysteinamid

Ebene gedreht werden.

Bei Verbindung 2 scheinen die Verhältnisse günstiger zu sein; durch die Lockerung der - CONH - - SH - Gruppierung nimmt die Zahl der für eine Reaktion günstigen Stellungen erheblich zu, unter Beibehaltung der Fixierung des zweiten Reaktionspartners.

In Verbindung 3 dagegen ist die starre Fixierung total aufgegeben, die Reaktanten können sich optimal nähern; die zunehmende Beweglichkeit führt aber andererseits zu einem leichten Absinken der Reaktionsgeschwindigkeit. Noch stärker ist der Effekt bei Verbindung 5 und 6 ausgeprägt, bei denen wegen der großen Beweglichkeit kaum noch die Rede von einer Vororientierung sein kann.

Die k'_2 - Werte zeigen im pH - Bereich von 8,5 - 9,0 eine leichte Zunahme und bleiben wie aus Tab. 15 ersichtlich ist bei weiterer pH Erhöhung konstant oder nehmen zum Teil stark ab.

Aus der anfänglichen Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten kann man schließen, daß S^- die katalytisch aktive Form ist. Bei pH - Werten über 9,5 ist die SH - Gruppe bei allen Verbindungen weitestgehend dissoziiert; eine weitere Zunahme der Geschwindigkeitskonstanten kann nur noch auf Erhöhung der OH^- Konzentration beruhen.

Die Abnahme der k_2 - Werte mit steigendem pH bedeutet ein Absinken der S^- - Konzentration. Trotz intensiver Argonbe-gasung der Lösungen vor und während der Reaktion, kommt es offensichtlich bei hohen pH - Werten zu Nebenreaktionen der S^- Gruppe.

8. Vergleich der Affinität der SH- und OH - Gruppe bei der intramolekularen Katalyse der Esterhydrolyse.

Ein direkter Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Geschwindigkeitskonstanten mit Literaturwerten ist verhält-

nismäßig schwierig, da alle Messungen bei unterschiedlichen pH - Werten und Temperaturen durchgeführt wurden.

Allgemein kann man feststellen, daß der Übergang von OH zu SH mit einem Absinken der Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse analog gebauter Ester verbunden ist. Die Größenordnung der Unterschiede gibt der Vergleich der Hydrolysekonstanten von Z-Asp(COOR)-SerNH₂ und Z-Asp(COOR)-CysNH₂ wieder. Der k_b - Wert der OH - Verbindung liegt bei pH 9,5 und 25° C bei $7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, für die SH - Verbindung wurde unter gleichen Bedingungen ein Wert von $2,9 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Beim Vergleich der übrigen Verbindungen ergibt sich ein ähnliches Bild; die kooperative Katalyse unter Beteiligung einer Thiolgruppe verläuft immer etwas weniger effektiv als die entsprechende durch eine Hydroxylgruppe katalysierte Reaktion.

Auf Grund der zuvor bei den intermolekularen Katalysen durchgeführten Überlegungen, muß man aus diesen Ergebnissen schließen, daß nicht die Nukleophilie sondern die Basizität der kooperativ beteiligten Gruppe für die Reaktionsgeschwindigkeit ausschlaggebend ist. Als möglicher Reaktionsmechanismus ergibt sich eine Variante von(VIII) mit einer OH - Gruppe anstelle einer SH - Gruppe.

Der Stickstoff der Amidbindung, dessen Wasserstoff durch den Elektronenzug der Carbonylgruppe als Proton abgehen kann, greift nach Übergabe des Wasserstoffs an S⁻ unter Imidbildung am Carbonylkohlenstoff des Esters an. Bei O⁻ als stärkerer Base erfolgt die Übernahme des Protons schneller als durch S⁻. Außerdem kann man sich vorstellen, daß O⁻ bei der anschließenden Hydrolyse des Imids die Funktion einer allgemeinen Basenkatalyse besser erfüllt als der wesentlich schwächer basische Schwefel.

9. Zusammenfassende Diskussion

Zum Studium der durch Carboxyl-, Thiol- und Imidazolgruppen kooperativ katalysierten Esterhydrolyse wurden Verbindungen synthetisiert, in denen die Möglichkeiten zur Wechselwirkung dieser potentiell katalytisch aktiven Gruppen zum Teil auch unter Veränderung der Abstände zueinander variiert wurden. Ihre katalytische Potenz wurde an der Beschleunigung der p-Nitrophenylacetathydrolyse getestet und aus der Effektivität der Katalyse Rückschlüsse auf Kooperativität gezogen. Folgende multifunktionelle Katalysatoren auf der Basis von Peptiden wurden untersucht:

- 8 Z-Asp-CysNH₂
- 9 Z-Asp-Gly-CysNH₂
- 10 Z-Glu-Gly-CysNH₂
- 11 Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂
- 12 Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂
- 13 Z-His-Ala-Asp-GlyOCH₃

Aus den durchgeführten Experimenten sind folgende Schlüsse zu ziehen: a) Aus einem Vergleich der katalytischen Konstanten von 12 und 13, die sich im Wesentlichen durch eine SH - Gruppe unterscheiden, geht hervor, daß die Einführung dieser SH - Gruppe zu einer Erhöhung von k_2 von $20 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ auf $2534 \text{ l mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, d.h. um zwei Zehnerpotenzen führt. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, steht aber im Widerspruch zu den Ergebnissen von Photaki et al, die bei Messungen der katalytischen Aktivität von Thr-Ala-Cys-His-Asp bei der p-Nitrophenylacetathydrolyse eine katalytische Konstante beschreiben, die von der Anwesenheit einer SH - Gruppe völlig unabhängig ist [23]. b) Die Messungen der durch die Verbindungen 8,9,10 und 11 katalysierten Esterhydrolysen ermöglichen einen Vergleich

des Einflusses einer Carboxylatgruppe bzw eines Imidazolrestes auf die Reaktivität der SH - Gruppe. Aus den für die katalytische Reaktion formulierten Mechanismen wird deutlich, daß die Nukleophilie der Thiolgruppe durch Wechselwirkung mit einer Base erhöht wird. Diese Funktion wird, wie die gemessenen katalytischen Konstanten bestätigen, durch den stärker basischen Imidazolstickstoff besser erfüllt als durch das schwächer basische Carboxylatanion. Die katalytischen Konstanten der Verbindungen 8,9 und 10 liegen um den Faktor 1,9, 1,8 und 2,5 höher als die unter Zugrundelegung des Brönstedschen Katalysegesetzes errechneten Werte, während sich bei Verbindung 11 der Faktor 3,9 ergab. c) Die Verbindungen 11 und 12 unterscheiden sich nur durch den Austausch von Glycin gegen Aspapaginsäure. Die berechneten Konstanten (Brönsted) werden durch Verbindung 11 um das 3,9 fache, bei Verbindung 12 um das 4,1 fache übertroffen; der Beitrag der Carboxylatgruppe ist bei dieser Verbindung nicht signifikant.

Es ist keine Modellverbindung zur Katalyse der NPA - Hydrolyse beschrieben, bei der der Quotient aus gemessener katalytischer Konstante durch die berechnete katalytische Konstante den Wert von 4 wesentlich übersteigt. Die Übereinstimmung dieses Quotienten bei den effektiven Katalysatoren unterschiedlichster Struktur ist auffallend. Es scheint, daß die Reaktivität des Schwefels in diesen Verbindungen, die eine $3,9 \pm 0,3$ fache Erhöhung der berechneten katalytischen Konstanten zeigen, optimal durch kooperative Beeinflussung erhöht ist, und eine weitere Steigerung der Geschwindigkeiten auf diesem Weg nicht erreicht wird.

Die Reaktivität des zu spaltenden Esters ist durch seine Struktur vorgegeben; die Reaktivität des nukleophil angreifenden Schwefels scheint nach diesen Untersuchungen in einigen Modellverbindungen auch ihr Maximum erreicht zu haben. Eine weitere Steigerung der Geschwindigkeitskonstanten in diesem System kann also nur noch durch optimale

Annäherung der beiden Reaktionspartner, d.h. über den Entropietherm erfolgen.

Für das Auftreten kooperativer Effekte bei diesen Katalysatoren sprachen folgende Befunde:

- a) die ermittelten katalytischen Konstanten sind größer als die durch Summation der nach Brönsted berechneten Konstanten der einzelnen katalytischen Gruppen.
- b) bei stark ausgeprägter Kooperativität findet man eine pH - Abhängigkeit der k_2 - Werte, die definitionsgemäß pH unabhängig sein sollten. Das Ausmaß dieser pH - Abhängigkeit ist eine Funktion des Quotienten

$$\frac{pK_{SH} + pK_{\text{anderer am katalytischen Prozeß beteiligten Gruppe}}}{2}$$

2

Fällt dieser Quotient in den pH - Bereich der Messung, so ist die pH - Abhängigkeit stark ausgeprägt.

- c) Durch intramolekulare Wechselwirkungen im Katalysator wird die Aktivierungsenergie der Reaktion gesenkt.

Durch kovalente Bindung zwischen den katalytisch aktiven Gruppen und dem zu spaltenden Ester ist bei den Modellsubstanzen zum Studium der intramolekularen Hydrolyse ein Teil der zuvor geforderten Vororientierung erreicht. Bei optimaler Lage der miteinander reagierenden Gruppen fällt der Prozeß der Annäherung des Esters an das reaktive Zentrum weg, und es kommt zu einer deutlichen Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten.

Der Austausch von OH gegen SH macht sich bei der intermolekular katalysierten Hydrolyse in einer Erhöhung der katalytischen Konstanten um das 100 fache bemerkbar; bei der intramolekular katalysierten Hydrolysereaktion dagegen wer-

den die Geschwindigkeitskonstanten beim Wechsel von OH zu SH um 50 % gesenkt. Dieser Unterschied ist durch die verschiedenen Mechanismen und der unterschiedlichen Stabilität der untersuchten Ester bedingt.

Bei der intramolekularen Katalyse erfüllt der Schwefel die Funktion eines allgemeinen Basenkatalysators zur Unterstützung des Angriffs des Amidstickstoffs am Carbonylkohlenstoff des Esters, während bei der intermolekularen Katalyse die Hydrolysereaktion mit einem direkten nukleophilen Angriff des Schwefels am Carbonylkohlenstoff des Esters eingeleitet wird.

Die intramolekulare Reaktion kann so nur erfolgen, wenn alle Reaktionspartner optimal zueinander angeordnet sind, d.h. bei direkter Nachbarstellung der Reaktanten. Bei der intermolekularen Hydrolyse ist die Wahrscheinlichkeit, daß der Ester durch den raumerfüllenderen, nukleophilen Schwefel angegriffen wird wesentlich höher, als der gerichtete Angriff des Amidstickstoffs auf den Carbonylkohlenstoff des Esters.

V. Präparativer Teil

1. Synthesen der Peptide

1.1. Synthesepläne

Zur Synthese des Pentapeptids Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ und des entsprechenden Glutaminsäure analogen Z-His-Ala-Glu-Gly-CysNH₂ wurden verschiedene Versuche unternommen. Schematisch lassen sich die unterschiedlichen Strategien kurz zusammenfassen:

Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂

_____ Strategie 1
 _____ Strategie 2
 _____ Strategie 3
 _____ Strategie 4

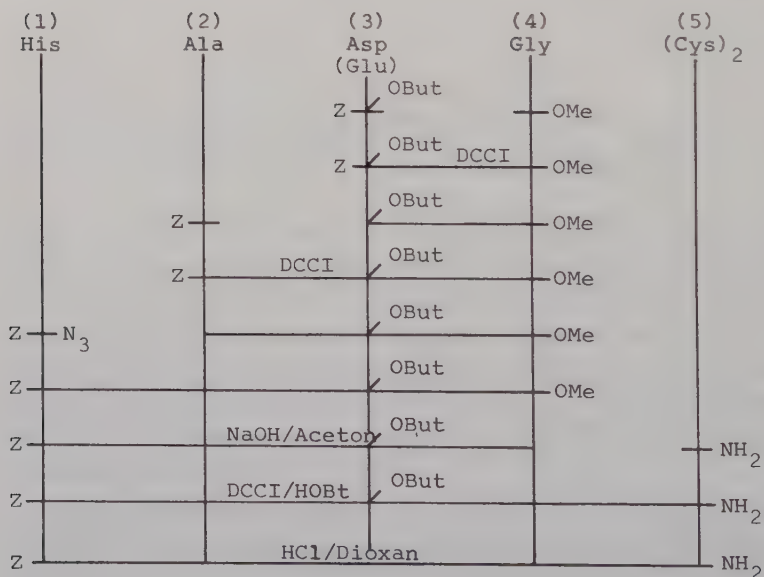


Abb.23 : Syntheschema Strategie 1.

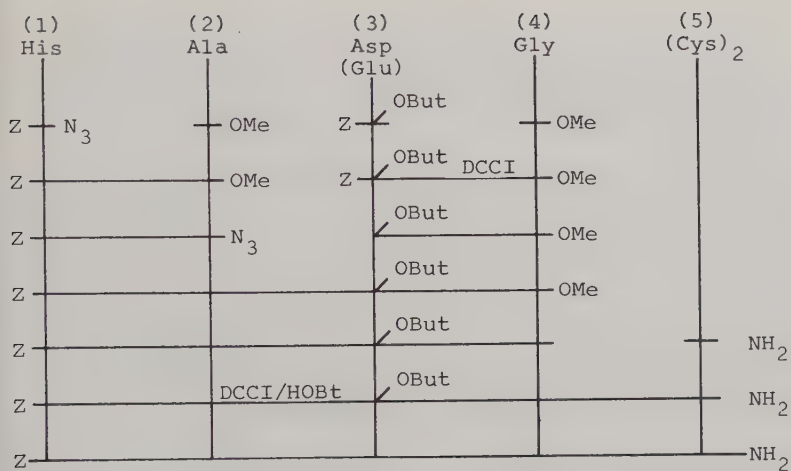


Abb.24 : Syntheseschema Strategie 2.

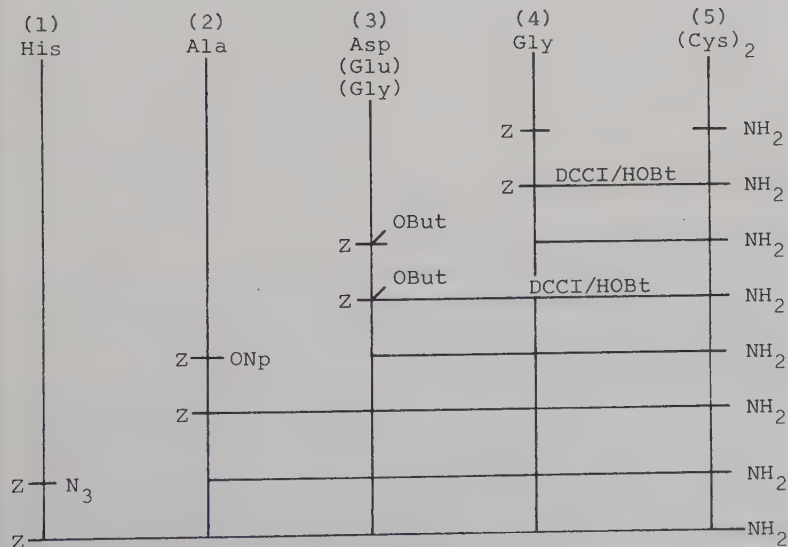


Abb.25 : Syntheseschema Strategie 3.

Strategie 1

Dem ursprünglichen Syntheseplan lag der Gedanke zugrunde, daß die Kupplung des Tetrapeptids (1 - 4) an Cystein bzw Cystin als letzter Schritt weniger Schwierigkeiten bereitet und mehr präparative Möglichkeiten offenläßt. Obwohl einige Synthesen beschrieben sind, bei denen cystein-haltige Peptide zur hydrogenolytischen Abspaltung von Schutzgruppen der katalytischen Hydrierung unterworfen wurden [72,73] , erschien es vorteilhafter, die schwierigen und zum Teil wenig schonenden Arbeitsbedingungen (z. B. Arbeiten in flüssigem Ammoniak als Lösungsmittel und große Katalysatorzugaben) zu umgehen.

Die Pentapeptide sollten am Ende der Synthese mit freier β - bzw γ -Carboxylgruppe, freier SH - Gruppe und ungeschütztem Imidazolkern vorliegen; während das Aminoende acyliert und das Carboxylende als Amid geschützt sein sollte, um störende Effekte dieser Gruppen bei den Messungen der katalytischen Eigenschaften der Verbindungen auszuschließen. Diese Forderungen mußten bei der Wahl der Schutzgruppen während der Synthese berücksichtigt werden.

Von den zahlreichen Möglichkeiten zum Schutz der Aminogruppe war der Carbobenzoxyrest geplant [74] , der nach jedem Syntheseschritt abgespalten werden sollte. Unter Berücksichtigung der möglichen Schutzgruppen für die β - bzw γ - Carboxylgruppe der Asparaginsäure bzw Glutaminsäure erwies sich der tert. Butyloxycarbonylschutz [75] der Aminogruppe als unvorteilhaft.

Zum Start der Synthese war $\text{GlyOCH}_3 \times \text{HCl}$ das günstigste Derivat, da dadurch die Verknüpfung des Tetrapeptids mit Cystinamid nach mehreren Verfahren erfolgen konnte. Der Methylester sollte zur freien Säure verseift werden, was eine anschließende Verknüpfung nach der DCCI / HOBt - Methode [76], oder nach Umsetzung zum p-Nitrophenylester nach

der aktiven Estermethode zuließ; bei eventuell auftretenden Schwierigkeiten bei der Verseifung wäre die Hydrolyse des Methylesters und anschließende Kupplung über die Azid - Methode [77,78,79] eine weitere Alternative.

Zur Einführung der Asparaginsäure bzw Glutaminsäure ergaben sich verschiedene Möglichkeiten, je nachdem ob man die weitere Synthese mit geschützter oder ungeschützter β (bzw γ) - Carboxylgruppe durchführt.

Bei Synthese mit ungeschützter Carboxylfunktion bietet sich der präparativ leicht zugängliche β (bzw γ) - Benzylester an, die Schutzgruppe ist hydrogenolytisch abspaltbar. Bei Verwendung des inneren Anhydrids als aktivierter Vorstufe zeigten sich die in der Literatur beschriebenen Schwierigkeiten, die Bildung einer Mischung der α, β bzw α, γ - Isomeren [80,81].

Obwohl die Synthesen einiger langkettiger Peptide z.B. des Gastrins [82] und des Ribonuklease - S - Proteins [83,84] ohne Schwierigkeiten mit freier Carboxylgruppe durchgeführt wurden, wurde zunächst vom Arbeiten mit freier β - Carboxylgruppe der Asparaginsäure abgesehen, da man bei den anschließenden Syntheseschritten auf die DCCI - Methode verzichten muß, und die Reinigung der Produkte erschwert ist.

Als Carboxylschutz mußte eine Gruppe gewählt werden, die die katalytische Hydrierung unbeschadet übersteht und am Ende der Synthese schonend abspaltbar ist. Auf Grund der bei der Verseifung von β (γ) -Methyl bzw Äthylestern der Asparagin und Glutaminsäure auftretenden Transpeptidierung [85] kam nur der tert. Butylester in Frage.

Alanin war entweder als Carbobenzoxyalanin mittels DCCI oder über den aktiven Ester als Carbobenzoxy-Alanin-p-Nitrophenylester an das Dipeptid zu knüpfen.

Histidin sollte am Imidazolkern ungeschützt als Carbo-benzoxyderivat eingesetzt werden. Es bot sich Z-His-Hydrazid als geeignete aktivierte Aminosäure an, da bei der Darstellung der Verbindung keinerlei Schwierigkeiten zu erwarten waren, und die Knüpfung der Peptidbindung als zuverlässig und immer noch verhältnismäßig racemisierungsfrei gilt, obwohl es nach neueren Arbeiten auch bei der Azidkupplung, vorallem bei TAA als Base zu geringer Racemisierung kommen soll [86,87,88].

Eine Verknüpfung des Histidins mit ungeschütztem Imidazolkern nach der DCCI - Methode wurde wegen der möglichen Nebenreaktionen nicht erwogen [89]. Ebenfalls schied die Synthese über aktive Ester wegen der Schwerzugänglichkeit der am Imidazol ungeschützten Z-(bzw Boc)-HisONp -Derivate aus.

Nach der ersten Strategie war geplant, das Tetrapeptid über die zuvor beschriebenen Möglichkeiten mit Cystein als letzter Aminosäure zu verknüpfen. Wegen der aufwendigen und verlustreichen Abspaltungsmethoden der üblichen S - Schutzgruppen sollte Cystein als Cystin eingeführt werden. Nach Umsatz von Cystin mit doppelt molaren Mengen Tetrapeptid sollte das entstehende Pentapeptiddisulfid nach Entfernung der tert. Butyl - Schutzgruppe reduktiv in die zwei Pentapeptide zerlegt werden. Es war eine Spaltung über Thiolyse, also Disulfidaustausch mit anderen SH - Verbindungen geplant. Von den möglichen üblicherweise verwendeten Verbindungen z.B. Dithiothreitol, Butanthiol [90,91] usw, sollte das zuvor schon häufiger benutzte Mercaptoäthanol [59] eingesetzt werden.

Strategie 2

Der zweite Syntheseweg der Pentapeptide stimmte von der Konzeption her -Verknüpfung des Tetrapeptids mit Cystein -

mit Strategie 1 überein. Der Unterschied bestand im Aufbau des Tetrapeptids, das in diesem Fall aus zwei Dipeptiden zusammengesetzt war. Die Synthese des Tetrapeptids sollte von den vorhandenen Dipeptiden Asp(BCOOH)-GlyOCH₃ oder Asp(BOtBut)-GlyOCH₃ bzw den entsprechenden Glutaminsäurederivaten ausgehen. Für das zweite Dipeptid war AlaOCH₃ x HCl als Ausgangsverbindung vorgesehen, das nach Verknüpfung mit Z-His-Hydrazid und anschließender Hydrazinolyse des Methylesters über die Azid - Methode mit dem vorliegenden Dipeptid zum Tetrapeptid verknüpft werden sollte.

Alle weiteren Syntheseschritte waren in Analogie zu Strategie 1 geplant.

Bei dieser Strategie wird die Zahl der Syntheseschritte nach dem Einführen der Aminodicarbonsäuren, die zu erheblichen Nebenreaktionen neigen [92], um einen vermindert. Nach dem Z-Asp(BOtBut)-GlyOCH₃, das nur mit schlechten Ausbeuten und unter erheblichen Reinigungsschwierigkeiten zu erhalten war, schloß sich nur noch ein Kupplungsschritt bis zum Tetrapeptid an.

Strategie 3

Da sich die Verknüpfung des geschützten Tetrapeptids mit Cystindiamid als schwierig und verlustreich herausstellte, wurde eine neue Strategie entwickelt, die von Cystindiamid ausgeht, und einen schrittweisen Aufbau des symmetrischen Disulfids verfolgt. Diese als "Cystin - Verfahren" in der Literatur beschriebene Methode wurde vor 20 Jahren bei der Synthese des C - terminalen Tetrapeptids des Oxytocins [93] eingeführt und bei zahlreichen anderen Synthesen, u.a. bei der Synthese des Gluthations [94] und bei Versuchen zur Insulinsynthese [95] mit Erfolg durchgeführt. Trotz einiger Nachteile, wie z.B. Verzicht auf kataiyti-

sche Abspaltung des Carbobenzoxystoffs, Schwerlöslichkeit der cystinhaltigen Peptide und der Möglichkeit zur Bildung asymmetrischer, kaum zu trennender Disulfide bei unvollständiger Umsetzung, erschien dieser Syntheseweg gegenüber den großen Schwierigkeiten bei der Verknüpfung des Tetrapeptids mit Cystindiamid als vorteilhaft.

Es konnten die von Syntheseweg 1 vorliegenden aktivierten und geschützten Aminosäuren eingesetzt werden. Die Carbobenzoxyschutzgruppe war mit HBr / Eisessig abzuspalten. Da bei Behandlung des symmetrischen Tripeptids Z-Asp(OtBut)-Gly-Cys-Disulfid ebenfalls der tert. Butylester gespalten wurde, mußten bei dieser Strategie die letzten zwei Kupplungsschritte mit freier β (bzw. γ) - Carboxylgruppe erfolgen. Daher war die Kondensation des Alanins an das Tripeptid über den aktiven Ester vorzunehmen, und die Verknüpfung mit Histidin als fünfter Aminosäure konnte, wie zuvor geplant, über Azid - Kupplung erfolgen.

Strategie 4

Wegen der auftretenden Schwierigkeiten beim Arbeiten mit freier β (bzw. γ) - Carboxylgruppe erschien es günstiger das Tripeptid (Asp-Gly-CysNH₂)₂ nur noch einem Kupplungsschritt zu unterwerfen. Deshalb sollte das Tripeptid mit dem Dipeptid Z-His-AlaNH₂ verknüpft werden. Durch Einsparen eines Kupplungsschritts konnte die Zahl der sich in geringem Umfang immer bildenden asymmetrischen Disulfide verringert werden. Nach Reduktion des Disulfids ergaben sich bei dieser Methode bessere Trennmöglichkeiten, da bei nicht vollständiger Umsetzung neben dem Pentapeptid nur Tripeptid vorliegen konnte, so daß sich aufgrund deutlicher Molekulargewichtsunterschiede und unterschiedlichem chemischen Verhalten mehr und effektivere Trennmöglichkeiten anboten.

1.2. Beschreibung der Versuche

Synthese nach Strategie 1

Die Umsetzung von $\text{GlyOCH}_3 \times \text{HCl}$ mit Z-Asp(OtBut) nach der DCCI - Methode unter Zusatz von HOBT verlief ohne besondere Schwierigkeiten mit guter Ausbeute. Das entstehende Dipeptid lag als chromatographisch einheitliches, von vielen Kristallen durchsetztes Öl vor und kristallisierte bei verschiedenen Versuchen nicht durch.

Die hydrogenolytische Abspaltung des Carbobenzoxysteers, und die anschließende Umsetzung mit Z-Ala führte zum geschützten Tripeptidester, der nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe nach der Azid - Methode mit Histidin gekuppelt wurde.

Neben den üblicherweise auftretenden Nebenreaktionen, der Umwandlung der Azide in Isocyanate (Curtius - Abbau) [96], die dann unter Bildung von Harnstoffderivaten mit der Aminkomponente reagieren, und der Bildung von Säureamiden [97,98], muß beim Carbobenzoxy - Histidin nach Zugabe der Base noch mit intra bzw intermolekularen Reaktionen des Imidazolstickstoffs gerechnet werden [99]. Zur Vermeidung der Isocyanat- und Amidbildung wurde eine Reaktionstemperatur von -5°C nicht überschritten, und durch schnelles Ausschütteln des Z-His-Azids aus der alkalischen Phase wurde die Möglichkeit zur Reaktion des Imidazolstickstoffs eingeschränkt. Die Ausbeute bei diesem Kupplungsschritt war nie wesentlich höher als 60%, und an die Synthese schlossen sich langwierige Reinigungsschritte an.

Da die Kondensation des Tetrapeptids an Cystindiamid mit freier Carboxylgruppe erfolgen sollte, wurde als nächster Schritt die Verseifung des Methylesters vorgenommen. Dieser Plan stellte sich bald als nicht durchführbar heraus, da alle Versuche den Methylester des Tetrapeptids zu verseifen ohne zufriedenstellendes Ergebnis verliefen. Bei milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, äquimolare

NaOH - Mengen, Arbeiten in Dioxan/Wasser - Gemisch) lag nach drei Stunden Reaktionszeit noch etwa 30 - 40 % des Esters unverseift vor, bei Verschärfung der Reaktionsbedingungen wurde der tert. Butylester mitangegriffen [100], und es ergaben sich zahlreiche nicht trennbare Nebenprodukte, die wahrscheinlich auch zum Teil auf α, β bzw α, γ - Transpeptidierungen [101,102] beruhten, da auch die ansonsten alkali stabile tert. Butyl - Maskierung der Carboxylfunktion den Cyclisierungsablauf, besonders unter den günstigen sterischen Verhältnissen mit Glycin als nächster Aminosäure, nicht verhindern kann.

Eine Übersicht über sämtliche möglichen Nebenreaktionen bei Peptidsynthesen mit Aminodicarbonsäuren ist in loc. cit.[92] zu finden.

Die einzige Möglichkeit, die Strategie 1 beizubehalten, lag in der Verknüpfung über das Säureazid. Die Hydrazinolyse des Methylesters gelang mit einem Überschuß an Hydrazinhydrat, aber es ergab sich nie ein einheitliches Reaktionsprodukt. Es wird angenommen, daß zu einem geringen Teil auch der tert. Butylester vorallem bei der Asparaginsäure der Hydrazinolyse unterliegt [103].

Nach Umsetzung des Hydrazids mit Natriumnitrit fiel das Azid als Öl aus. Die Isolierung des Azids war dadurch so langwierig, daß angenommen werden muß, daß sich das Azid zu einem großen Teil bei dieser Prozedur zersetzte. Zur Kupplung des Tetrapeptids an Cystindiamid mußte also ein großer Überschuß an Carboxylkomponente eingesetzt werden. Trotzdem kam es nie zu einer vollständigen Umsetzung mit Cystindiamid, nach der Reaktion lagen immer erhebliche Mengen asymmetrisches Reaktionsprodukt vor, das praktisch von dem symmetrischen Disulfid nicht zu trennen war.

Synthese nach Strategie 2

Die beiden zur Verknüpfung zum Tetrapeptid vorgesehenen Dipeptide ließen sich problemlos darstellen. Die Kondensation erfolgte über die Azid - Methode. Da bei der Synthese des Azids aus Z-His-Ala-Hydrazid die zuvor beschriebenen Schwierigkeiten und Nebenreaktionen auftraten, wurde die Diazotierung hier mit Isoamylnitrit bei -40°C nach Rudinger [78] vorgenommen. Das Tetrapeptid war über diesen Syntheseweg wesentlich schneller und mit besseren Ausbeuten darzustellen. Bei der Verknüpfung zum Pentapeptid bestehen bei Syntheseweg 2 jedoch die gleichen Schwierigkeiten wie bei Syntheseweg 1.

Synthese nach Strategie 3

Das symmetrische Dipeptid Z-Gly-CysNH₂ - Disulfid ließ sich in guter Ausbeute darstellen, und bei einem 30%igem Überschuß der Carboxykomponente ergab sich ein einheitliches Reaktionsprodukt. Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte mittels HBr/Eisessig. Die Kupplung mit Z-Asp(OtBut) bzw Z-Glu(OtBut) mit DCCI/HOBt lieferte die entsprechenden Tripeptide. Das asparaginsäurehaltige Peptid ließ sich leicht reinigen und war chromatographisch einheitlich, während das Glutaminsäurederivat auch nach zahlreichen Reinigungsschritten eine schwache ebenfalls Chlor - Tolidin positive Nebenbande im Chromatogramm aufwies.

Nach Abspaltung der Schutzgruppen wurde die Kondensation mit Z-AlaONp unter Zusatz von HOBt als Katalysator [104] durchgeführt. Bei diesem Reaktionsschritt traten unerwartet Schwierigkeiten auf; bei allen möglichen Verhältnissen von Carboxylkomponente zu Aminokomponente konnte kein einheitliches Reaktionsprodukt isoliert werden. Es ergaben sich zwei, in ihrem chemischen Verhalten sehr

ähnliche, chromatographisch kaum trennbare Produkte, die nach Abspaltung der Schutzgruppe und Kondensation mit Histidin beide reagierten. Am Ende der Synthese lag ein Gemisch zahlreicher Pauly positiver Produkte vor, das mit den üblichen Mitteln nicht zu trennen war.

Als Erklärung für die Schwierigkeiten wurde eine Behinderung der Aminogruppe durch die freie Carboxyl - Funktion im Tripeptid angenommen, die auch durch Salzbildung mit TAA nicht zu beseitigen war. Eine Bestätigung der Annahme wurde darin gesehen, daß die Umsetzung bei dem asparaginsäurehaltigen Peptid wesentlich glatter verlief, als bei dem durch eine CH_2 - Gruppe beweglicherem glutaminsäurehaltigen Peptid.

Verzichtete man auf die Carboxylfunktion und kuppelte statt der Aminodicarbonsäure Glycin als dritte Aminosäure, so konnte das Pentapeptid Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂ - Disulfid ohne jede Schwierigkeiten einheitlich nach dieser Strategie synthetisiert werden.

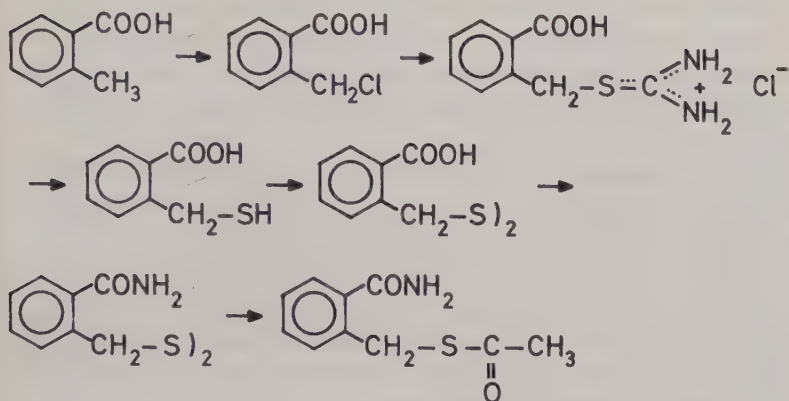
Synthese nach Strategie 4

Die geschützten Tripeptide Z-Asp(OtBut)-Gly-CysNH₂ - Disulfid und Z-Glu(OtBut)-Gly-CysNH₂ - Disulfid werden aus Syntheseweg 3 übernommen. Da sich herausgestellt hatte, daß sich die Nebenprodukte bei den nächsten Kupplungsschritten potenzierten, wurden diese Tripeptide nur noch einer Umsetzung unterworfen. Z-His-AlaNH₂ wurde nach der von Rudinger variierten Azid - Methode mit Isoamylnitrit bei - 40° C mit 30 %igem Überschuß an Carboxylkomponente mit Tripeptid zum Pentapeptid umgesetzt.

Bei dem asparaginsäurehaltigen Peptid wurde ein einheitliches, analysenreines Produkt isoliert; während bei dem glutaminsäurehaltigen Peptid ein zweites Pauly positives Produkt nicht vollständig zu entfernen war.

1.3 Mercaptomethylbenzoesäure und Derivate

Syntheseschritte:



Ausgangsprodukt zur Darstellung der Mercaptomethylbenzoesäure war o-Methylbenzoesäure; durch Chlorierung mit Sulfurylchlorid unter Zusatz eines Kettenstarters konnte ohne Schwierigkeiten o-Chlormethylbenzoesäure dargestellt werden. Das Schwefelatom wurde unter Bildung des Thiuroniumsalzes durch Thioharnstoff in die Verbindung eingeführt; nach Verseifung mit Natronlauge erhielt man die freie SH - Verbindung.

Das Endprodukt war weitgehend oxidationsunempfindlich; die geringe Abnahme des SH - Gehalts bei längerem Stehen beruhte, wie sich chromatographisch nachweisen ließ, auf der Bildung von Thiophthalid.

Derivate der o-Mercaptomethylbenzoesäure

Ester

Alle Versuche die Carboxylgruppe nach den üblichen Verfahren direkt mit Methanol zu verestern, schlugen fehl. Es wurde je nach Reaktionsdauer ein Gemisch aus Säure und Thiophthalid, oder nur Thiophthalid erhalten. Um zu entscheiden, ob die der Veresterung zugesetzten wasserentziehenden Mittel den Ringschluß direkt bewirken, oder ob durch die Veresterung der Carboxylgruppe der nukleophile Angriff des Schwefels so erleichtert wird, daß sich in einer sofort anschließenden Reaktion der Ring zum Thiophthalid schließt, wurde die Säure mit Isopropanol umgesetzt. Obwohl erwartet werden muß, daß der entstehende Ester aufgrund sterischer Hinderung nicht so leicht angegriffen werden kann, wurde in der Reaktionslösung nur Thiophthalid gefunden.

Da die Synthese eines Esters mit freier SH - Gruppe nicht gelang, wurde die Verbindung mit Eisen(III) - Chlorid zum Disulfid oxidiert. Nach Umsetzung mit Thionylchlorid und MeOH bildete sich der Diester des Disulfids.

Dieses Disulfid wurde mit Mercaptoäthanol, Natriumborhydrid und Dithiotreid reduziert; als Endprodukt wurde in allen Fällen Thiophthalid isoliert.

Aus diesen Versuchen wurde geschlossen, daß der Ester der freien SH - Verbindung, wegen der starken Ringschlußtendenz instabil ist.

Amide

Da beim Übergang von der freien Carboxylgruppe zur Estergruppe große Unterschiede in der Stabilität bestanden, wurden Versuche zur Darstellung des Säureamids unternommen, dessen Carbonylaktivität zwischen der einer Carbonsäure

und eines Carbonsäureesters liegt.

Nach vorausgegangener Oxidation der Mercaptomethylbenzoesäure zum Disulfid konnte das Diamid nach der mixed Anhydrid Methode dargestellt werden; auch bei dieser Verbindung bildete sich während der Reduktion Thiophthalid. Unterwarf man das Disulfid jedoch einer reduktiven Acetylierung, so erhielt man das S-Acyl - Derivat des Säureamids.

S-Acetyl - Verbindungen mit freier Carboxylgruppe

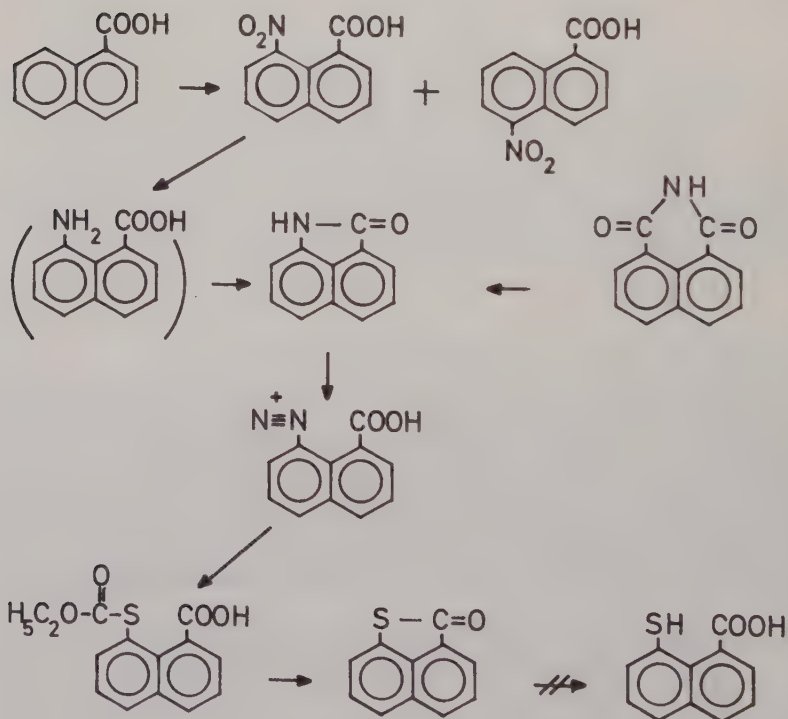
Zur Acetylierung der SH - Gruppe wurde o-Mercaptomethylbenzoesäure mit Acetanhydrid, Acetylchlorid und Benzoylchlorid umgesetzt; auch diese Versuche führten zur Thiophthalidbildung und Hydrolyse zu Essigsäure bzw Benzoesäure.

Darstellung von Ester bzw Amid aus Thiophthalid

Es wurden verschiedene Versuche unternommen, den cyclischen Thioester zu öffnen. Die Umsetzung mit Benzylamin und Diäthylamin brachte kein befriedigendes Ergebnis. Nach Reaktion mit Natriummethylat war zwar kein Thiophthalid mehr nachweisbar, durch die starke Basizität des angewandten Reagenz kam es aber zu zahlreichen Nebenreaktionen.

1.4. 8-Mercapto-1-Amino-Naphthoesäure

Syntheseschritte:



Die Nitrierung der 1-Naphthoesäure verlief mit gleicher Wahrscheinlichkeit in 5 und in 8 - Stellung; an den Nitrierungsschritt schloß sich daher eine langwierige Isomerentrennung an.

Die 8-Nitro-1-Naphthoesäure wurde zu 8-Amino-1-Naphthoesäure hydriert. Die katalytische Hydrierung verlief problemlos. Das freie Amin konnte nicht isoliert werden, da sich sofort Naphthostyryl bildete, das Lactam der 8-Amino-1-Naphthoesäure.

Trotz schlechterer Ausbeuten erwies sich die Darstellung von Naphthostyryl durch Hofmann Abbau des Naphthalimids als günstiger. Die geringe Ausbeute wurde auf die Instabilität des für diese Umlagerung notwendigen Halbamids zurückgeführt.

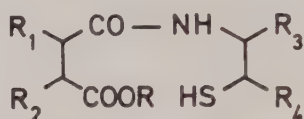
In Natronlauge ließ sich das Naphthostyryl zu dem Salz der 8-Amino-1-Naphthoesäure öffnen. Zur Einführung des Schwefels in die Verbindung diazotierte man die freie Amino-Verbindung und setzte das Diazoniumsalz mit Natriumäthylxanthogenat um. Das Xanthogenat konnte isoliert werden, und nach Verseifung bildete sich der innere Thioester der 8-Mercapto-1-Naphthoesäure. Alle Versuche, die freie SH-Verbindung zu erhalten, mißlingen. Der Thioester war unlöslich in Natriumcarbonatlösung und in kalter verdünnter Natronlauge; erst bei Erwärmen in 10 %iger Natronlauge trat Lösung unter Salzbildung ein. Die Verbindung wurde aber bei vorsichtigem Neutralisieren wieder unverändert ausgeschieden. Der Austausch des Natriums gegen Wasserstoff über einen Ionenaustauscher führte ebenfalls zum Thioester.

Derivate der 8-Amino-1-Naphthoesäure und des Naphthostyryls

Die freie 8-Amino-1-Naphthoesäure wurde nicht erhalten, da sich das Lactam spontan in allen Lösungsmitteln bildete. Zugänglich war nur das Natriumsalz der Säure über eine Ringöffnung mit Natronlauge.

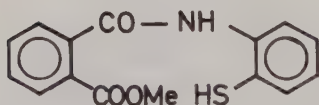
Bei Umsetzung mit Acetylchlorid und Acetanhydrid erfolgt ebenfalls immer Ringschluß zu dem entsprechenden N-acetylierten Produkt des Naphthostyryls.

1.5 Synthesen der Verbindungen des Typs

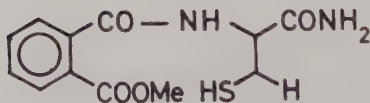


und um eine CH_2 - Gruppe erweiterte Analoge.

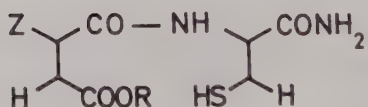
Es wurden folgende Verbindungen dieser Gruppe synthetisiert:



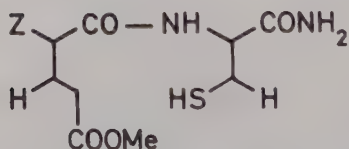
1.5.1. N(o-Carbomethoxy-Benzoyl)-o-Aminothiophenol.



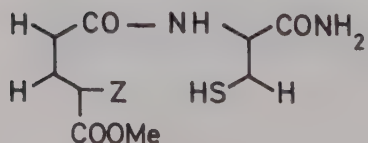
1.5.2. Phthalylmonomethylester-cysteinamid.



1.5.3. Z-Asparagyl(βOMe)-Cysteinamid.



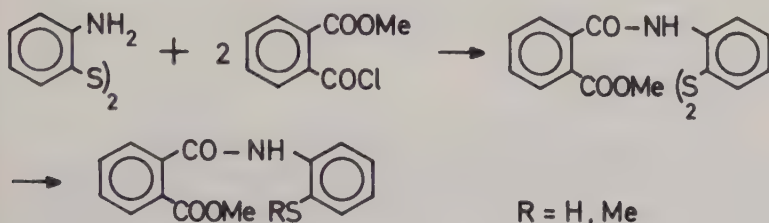
1.5.4. Z-Glutamyl(γOMe)-α-Cysteinamid.



1.5.4. Z-Glutamyl(αOMe)-γ-Cysteinamid.

1.5.1. N(o-Carbomethoxy-Benzoyl)-o-Aminothiophenol
und Derivate.

Syntheseschritte:



Die Kupplung des Amins mit dem Säurechlorid zum Säureamid verlief unter starker Wärmetönung. Die Reinigung des Reaktionsprodukts bereitete einige Schwierigkeiten, da es als Öl anfiel, und die Kristallisation nur sehr langsam erfolgte.

Das Disulfid wurde mit Mercaptoäthanol reduziert, es wurde ein SH - Gehalt von 96 % erzielt.

Zur Darstellung des Thioesters wurde die freie SH - Gruppe mit Diazomethan umgesetzt.

1.5.2 Di-Phthalyl-monomethylester-Cysdiamid und Derivate.

Die Synthese dieser Verbindung wurde auf zwei Wegen durchgeführt:

Bei der Umsetzung von Cystindiamid mit Phthalsäuremonoesterchlorid war die Reinigung aufwendig und die Ausbeute

sehr schlecht. Versuche, den Phthalsäuremonoester nach der DCCI - Methode mit Cystindiamid zu kuppeln, verbesserten das Ergebnis auch nicht wesentlich.

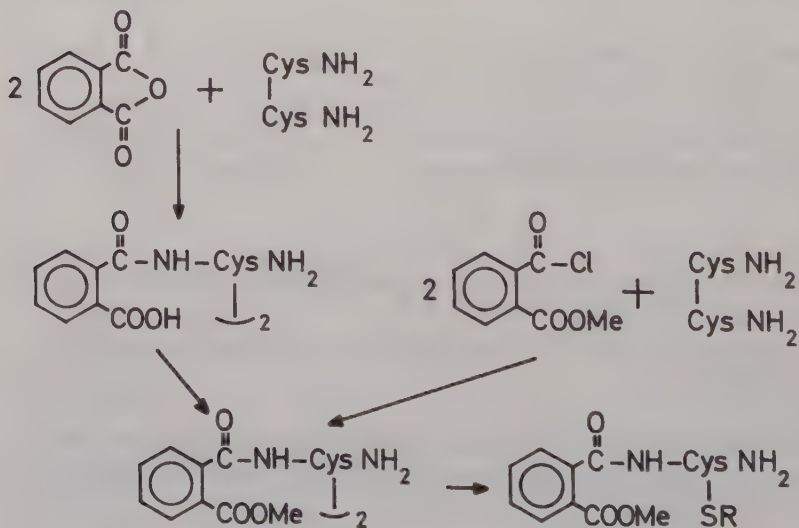
Deshalb wurde die Umsetzung in zwei Schritte aufgegliedert; zuerst wurde Phthalsäureanhydrid mit Cystindiamid zum Di-Phthalyl-Cysdiamid umgesetzt.

Außer der schlechten Löslichkeit des Cystindiamids ergaben sich bei dieser Synthese keine Probleme. Das Endprodukt konnte leicht isoliert und gereinigt werden und fiel in guter Ausbeute an.

Die sich diesem Schritt anschließende Veresterung mit Diazomethan war ebenfalls problemlos und führte zu einem Endprodukt, das mit dem des anderen Synthesewegs identisch war.

Die anschließende Reduktion mit Mercaptoäthanol und die Bildung des Thioäthers führte zu den gewünschten Derivaten der Verbindung.

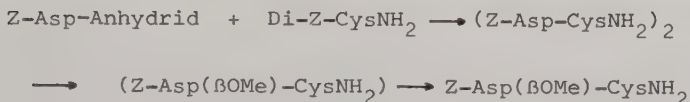
Syntheseschritte:



R = H, Me

1.5.3 Z-Asparagyl- β -Methylester-Cystein.

Syntheseschritte:



Die Peptidbindung wurde über Z-Asp-Anhydrid geknüpft. Neben nicht umgesetztem Z-Asp-Anhydrid und freier Z-Asp konnte chromatographisch wenig über die β -Carboxylgruppe verknüpftes Dipeptid nachgewiesen werden. Dieses Nebenprodukt ließ sich durch mehrfaches Umkristallisieren entfernen.

Die Umsetzung mit Diazomethan zum β -Methylester und die anschließende Reduktion des Disulfids mit Mercaptoäthanol bereitete erwartungsgemäß keine Schwierigkeiten.

Der anolge β -Benzylester wurde aus Z-Asp(BOBenzyl) und Cystindiamid nach der DCCI - Methode synthetisiert.

1.5.4. Z-Glu(α OMe)- γ CysNH₂ und Z-Glu(γ OMe)- α CysNH₂ .

Diese Verbindungen wurden durch Umsetzung der entsprechenden Z - geschützten Glutaminsäureester mit Cystindiamid nach der DCCI - Methode synthetisiert. Die Reduktion der Disulfide erfolgte mit Mercaptoäthanol.

Die Reaktionen verliefen mit den üblichen Ausbeuten, und die Endprodukte ließen sich gut reinigen.

2. Zusammenfassung der Ergebnisse und Diskussion zu den Synthesen.

2.1 Peptidsynthesen

Es wurden folgende Peptide synthetisiert:

Z-Asp-CysNH₂ (BOMe und BOBenzyl)

Z-Asp-Gly-CysNH₂ (BOMe und BOBenzyl)

Z-Glu-Gly-CysNH₂ (YOMe und OBenzyl)

Z-His-Ala-Asp-GlyOCH₃

Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂

Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂

Die Synthese der analogen Glutaminsäurederivate bereitete unerwartete Schwierigkeiten, so daß Z-His-Ala-Glu-Gly-CysNH₂ und Z-His-Ala-Glu-GlyOCH₃ nicht mit ausreichender Reinheit erhalten wurde.

Allgemein wirkte sich der Übergang von Asparaginsäure zu Glutaminsäure löslichkeitsvermindernd aus, und es ergaben sich bei den Verknüpfungen schlechtere Ausbeuten und mehr Nebenprodukte.

Die Umsetzung Glu-Gly-CysNH₂ - Disulfid mit Z-AlaONp bzw Z-Ala, die bei dem analogen Asparaginsäurederivat ohne Schwierigkeiten gelang, führte nur in geringer Ausbeute zum symmetrischen Disulfid Z-Ala-Glu-Gly-CysNH₂ und war von einem sich chromatographisch sehr ähnlich verhaltenden Produkt (vermutlich asymmetrisches Disulfid) auch säulen-chromatographisch nicht zu trennen.

Ebenso ergaben sich bei der Umsetzung von Z-His-AlaNH₃ mit Glu-GlyOCH₃, nach den positiven Erfahrungen mit der Synthese des entsprechenden asparaginsäurehaltigen Tetrapeptids, unerwartete Schwierigkeiten. War dagegen die Carboxylgruppe durch Esterbildung geschützt (YOMe, YOBenzyl, YOtBut), so gelang die Synthese.

Nach diesen vergleichenden Versuchen wird angenommen, daß die Schwierigkeiten bei der Synthese auf das Vorliegen der freien γ Carboxylgruppe der Glutaminsäure zurückzuführen sind.

Die Beobachtung, daß bei den analogen asparaginsäurehaltigen Peptiden die freie Carboxylgruppe sich im Gegensatz dazu nicht störend auswirkte, kann mit der um eine CH_2 - Gruppe verringerten 'Reichweite' und damit verbundenen geringeren Beweglichkeit der Carboxylgruppe der Asparaginsäure erklärt werden. Man kann sich vorstellen, daß durch die Annäherung der Carboxylgruppe an die Aminogruppe der zu kuppelnden Aminkomponente die Basizität dieser Gruppe herabgesetzt wird, was die Bildung der Peptidbindung erheblich erschwert.

Auf Grund dieser Erfahrungen scheint es nicht empfehlenswert, Peptidsynthesen mit ungeschützter γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure durchzuführen.

Von den synthetisierten Peptiden wurden IR - Spektren aufgenommen. In allen Fällen war die SH - Bande bei $2600 - 2550 \text{ cm}^{-1}$ sehr schwach ausgeprägt, was als ein Zeichen für eine intramolekulare Wechselwirkung gewertet werden kann und mit IR - Messungen vergleichbarer Verbindungen gut übereinstimmt. Alle übrigen zu erwartenden Schwingungen konnten gefunden werden und zeigten keine wesentlichen Verschiebungen. Auf Grund der zahlreichen funktionellen Gruppen und der vielen verschiedenen CH - und Gerüstschwingungen waren die Spektren sehr komplex und sind ohne systematische Untersuchungen im gleichen System nicht voll zu interpretieren. Als typischer Vertreter dieser Gruppe ist das IR - Spektrum des Pentapeptids Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂ in Abb. 26 wiedergegeben.

Die UV - Spektren der synthetisierten Peptide zeigten in wässriger Lösung alle das erwartete Maximum der Thiolatabsorption im Bereich von $220 - 240 \text{ nm}$. Die pH - Abhängigkeit ist in Abb. 27 wiedergegeben.

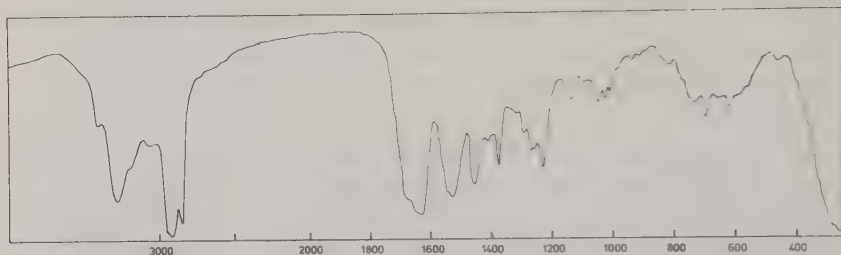


Abb. 26

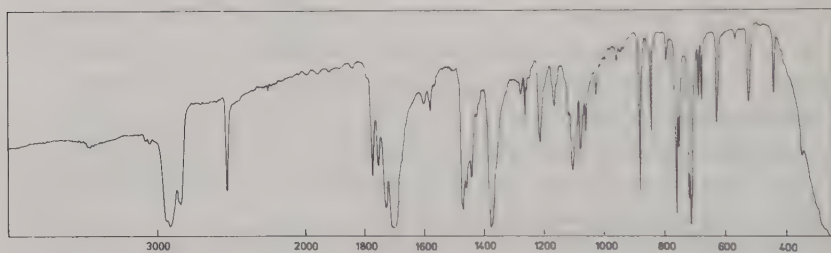


Abb. 28

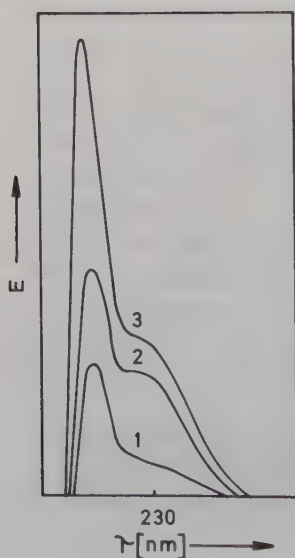


Abb. 27

Abb. 26: IR - Spektrum der Verbindung Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂.

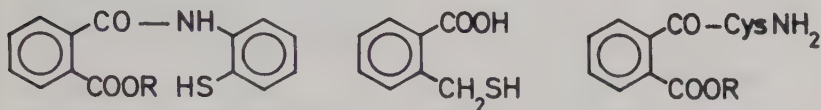
Abb. 27: UV - Spektrum der Verbindung Z-Asp-Gly-CysNH₂ bei verschiedenen pH - Werten.

1) pH 6,00, 2) pH 8,00,
3) pH 12,00.

Abb. 28: IR - Spektrum der Verbindung N(o-Carbomethoxy-Benzoyl) o-Aminothiophenol.

2.2 Diskussion zur Synthese der übrigen Modellverbindungen.

Außer den Peptiden wurden noch folgende Verbindungen synthetisiert:



Die Synthese dieser Verbindungen gelang mit zufriedenstellender Ausbeute und guter Reinheit.

Im Gegensatz zu den SH - Peptiden war vorallem bei den Estern eine ausgeprägte SH - Schwingung aufzufinden (Abb.28).

o-Mercaptomethylbenzoesäure und Derivate.

Wie bereits im vorausgegangenen Abschnitt beschrieben, gelang es nicht, Ester oder Amide der o-Mercaptomethylbenzoesäure zu synthetisieren. Ebenso scheiterten alle Versuche, bei freier Carboxylgruppe zu einem Thioester zu gelangen.

Dagegen konnte die Synthese von o-Mercaptomethylbenzoesäureamid ohne jede Schwierigkeit durchgeführt werden.

Da es bei den beschriebenen Reaktionsbedingungen unmöglich erscheint, daß keine Reaktion der Carboxylgruppe mit den eingesetzten Alkoholen und Aminen stattfand, kann nur eine durch die benachbarte SH - Gruppe katalysierte sofort erfolgende Rückreaktion angenommen werden. Diese Reaktion setzt einen nukleophilen Angriff der SH - Gruppe am Carboxylkohlenstoff voraus. Als Beweis für diese Annahme dienen die erfolgreichen Ester- und Amidbildungen nach Blockie-

rung der SH - Gruppe durch Disulfidbildung.

Andererseits kann das Scheitern der Versuche, die SH - Gruppe bei freier Carboxylgruppe in eine Thioesterbindung zu überführen, mit einer intramolekularen Wechselwirkung zwischen SH und Carboxyl - Gruppe erklärt werden, die die nukleophile Reaktivität soweit abschwächt, daß keine Umsetzung mehr erfolgt.

In einer dritten Versuchsreihe wurden Experimente unternommen, die gewünschten Derivate über nukleophile Substitution des intramolekular gebildeten Thioesters zu erhalten. Da diese Versuche beim Phthalid, dem entsprechenden intramolekularen Sauerstoffester erfolgreich beschrieben sind [105], wurden keine Schwierigkeiten vermutet, den im allgemeinen energiereicheren Thioester in eine Reaktion einzubeziehen.

Überraschenderweise wurde nach Umsetzung des Thioesters mit allen möglichen basischen Reagenzien immer wieder Thiophthalid isoliert.

Dieses Ergebnis kann auf zwei verschiedene Arten interpretiert werden:

a) Der Thiophthalidring läßt sich nicht öffnen, da der Carbonylkohlenstoff durch die Ringbildung und die Nachbarstellung des Schwefels so abgeschirmt ist, daß die eingesetzten basischen Reagenzien das C - Atom nicht erreichen.

b) Der Thiophthalidring wird geöffnet, das entstehende Produkt ist durch den benachbarten Schwefel instabil, und es erfolgt sofort wieder Ringschluß.

Zu a)

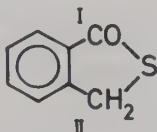
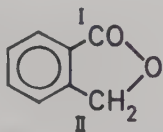
Zur Erklärung dieser Befunde muß man sich das unterschiedliche Verhalten des Schwefels und des Sauerstoffs in

einer chemischen Bindung vergegenwärtigen.

Auf Grund der Stellung im Periodensystem ist Schwefel weniger elektronegativer als Sauerstoff, das bewirkt eine größere Basizität des Sauerstoffs gegenüber Schwefel. Der Schwefel dagegen ist wegen seines diffuseren Elektronensystems polarisierbarer, d.h. er besitzt eine verglichen mit dem Sauerstoff größere Nukleophilie.

Wird eine Bindung zweier Atome verschiedener Elektronegativität gebildet, so halten sich die Elektronen im zeitlichen Mittel näher am stärker elektronegativen Atom auf, die Bindung wird dadurch polar und die Bindungsenergie steigt an.

Bezieht man diese Überlegungen in die Diskussion über die Reaktivität der beiden Systeme Phthalid und Thio-phthalid ein,



sollte man bei der Betrachtung der Bindung $\text{CH}_2\text{-O}$ bzw. $\text{CH}_2\text{-S}$ bezüglich der Elektronendichte am C II Atom folgendes erwarten:

Wegen der Elektronegativitätsdifferenzen bei der CO - Bindung sollte die Elektronendichte am Sauerstoff größer sein, die Abschirmung des Kohlenstoffs also geringer; die Elektronegativitätsdifferenz bei der CS - Bindung ist dagegen geringer, so daß im Vergleich dazu eine stärkere Abschirmung des C - Atoms vorliegen müßte.

Ein Maß für die Abschirmung eines Atoms ist seine im Vergleich zu einem Standard gemessene Verschiebung im ^{13}C NMR Spektrum, also sein Verhalten im magnetischen Feld.
(Eine geringere Abschirmung bedeutet eine größere Ver-

schiebung im Spektrum).

Tatsächlich wurden bei der ^{13}C NMR Messung der beiden Verbindungen die erwarteten Verschiebungen gefunden (Abb.29).

Diese Feststellungen gelten nur für den sp^3 - Kohlenstoff und können nicht auf jede CO bzw CS - Bindung übertragen werden. Dies wird schon deutlich, wenn man das C I Atom der Verbindung betrachtet. Hier liegt ein sp^2 - Kohlenstoff vor; der Effekt der Elektronegativität ist wieder gleichstark und gleichgerichtet wie bei dem zuvor betrachteten C II, nur wird dieser Effekt im Falle einer sp^2 - Bindung von einem unterschiedlichen Doppelbindungsanteil bei Übergang von der ersten Periode auf die zweite durch die zunehmende Größe der Atomrümpfe erheblich abgeschwächt. Somit ist der Doppelbindungsanteil, und damit die Abschirmung des C - Atoms bei dem O=C-O System stärker als bei dem entsprechenden O=C-S System; d.h. die Thioesterbindung ist stärker polarisiert, energiereicher und einem nukleophilen Angriff zugänglicher.

Alle erwarteten Effekte kommen beim Vergleich der ^{13}C NMR Spektren der beiden Verbindungen zum Ausdruck:

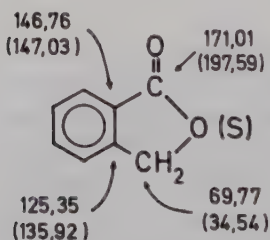


Abb. 29:

Vergleich der ^{13}C NMR Spektren von Phthalid und Thio-phthalid in ppm relativ zu iTMS.

Wendet man diese Überlegungen auf das konkrete Problem an, kommt man zu dem Ergebnis, daß die Überlegung unter a) mit Sicherheit nicht zutrifft, sondern die Reaktion wie unter b) beschrieben verläuft.

8-Mercapto-1-Naphthoesäure

Alle Versuche die 8-Mercapto-1-Naphthoesäure in offener Form zu erhalten schlugen fehl, da die starre Fixierung der funktionellen Gruppen in Nachbarstellung den Ring-schluß so stark begünstigen.

Bereits in einer Arbeitsanleitung aus dem Jahre 1908 werden die Nachbargruppeneffekte von 1,8 disubstituierten Naphthalinderivaten ausgenutzt: Zur Isomerentrennung, der bei der direkten Nitrierung von 1-Naphthoesäure entstehenden Isomeren 5-Nitro-1-Naphthoesäure und 8-Nitro-1-Naphthoesäure wird zu einer Veresterung des Reaktionsgemisch geraten, da nur die 5-Nitro-1-Naphthoesäure einen Ester bildet, so daß die isomere Säure leicht mit Alkali auszuschütteln ist.

Schon auf der Stufe der Nitroverbindung ist die gegenseitige Beeinflussung der funktionellen Gruppen in 1,8 Stellung so stark, daß keine Veresterung der benachbarten Carboxylgruppe mehr erfolgt. Die starke Wechselwirkung der entsprechenden 8-NH₂ und 8-SH - Derivate der 1-Naphthoecarbonsäure ist daher nicht überraschend.

Die bei den Synthesen auftretenden Schwierigkeiten zeigen eindrucksvoll, wie stark sich Nachbargruppeneffekte auswirken.

3. Experimenteller Teil

3.1. Material und Methoden

Zur Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen, Aufklärung der Struktur und Überprüfung der Einheitlichkeit wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

Schmelzpunktbestimmung

Die angegebenen Werte sind unkorrigiert und wurden in dem Gerät nach Dr. Tottoli ermittelt.

Bestimmung der optischen Drehung

Zur Ermittlung der Drehwerte wurde das Polarimeter der Firma Perkin Elmer benutzt.

CHN - Analysen

Die CHN - Analysen wurden in der zentralen Analytik des Fachbereichs Chemie ausgeführt.

Aminosäure - Analyse

Die Aminosäureanalysen wurden am Beckmann Unicrom durchgeführt.

Zur Hydrolyse versetzt man die Peptide mit 6 n HCl, begast sorgfältig mit Argon und erhitzt im zugeschmolzenen Rohr 24 h auf 110° C.

IR- und NMR - Spektren

Die Spektren wurden im Fachbereich Chemie an folgenden Geräten aufgenommen:

IR: Perkin Elmer 457

¹H NMR: Varian T 60

¹³C NMR Varian CFT 20

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Es wurden Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien der Firma Riedel de Haen verwendet; als Laufmittel dienen:

- I n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)
- II n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30:20:6:24)
- III n-Butanol/Eisessig/Methanol/Pyridin/Methylenchlorid/Wasser (4:1:1:1:2:1)
- IV Propanol/Amoniak/Wasser (6:3:1)
- V Chloroform/Eisessig (9:1)
- VI Chloroform/Cyclohexan/Eisessig (9:9:2)

Die Chromatogramme wurden mit folgenden Sprühreagenzien behandelt:

a) 5 %ige Ninhydrinlösung in n-Butanol [106]

Das Reagenz wurde bei Verbindungen mit freier Aminogruppe oder BOC - geschützter Aminogruppe benutzt. Nach Einsprühen mit der Lösung ließ man die Chromatogramme zur Entwicklung einige Minuten im Trockenschrank bei 110° C.

b) 0.05 m Boraxlösung, Cl₂-Gas, essigsäure Lösung von Tolidin und KJ.

Die Chlor-Tolidinreaktion wurde bei Verbindungen mit Amidgruppierung durchgeführt[107,108] Nach Besprühen der Chromatogramme mit Borax - Lösung wurden sie fünf Minuten im Trockenschrank erhitzt und anschließend mit dem Chlor - Tolidin - Reagenz besprüht.

Chromatogramme können ohne gegenseitige Beeinträchtigung der Nachweisreaktionen nacheinander nach Verfahren a) und b) behandelt werden.

c) Pauly Reagenz [109,110]

- Komponente I 1 %ige Sulfanilsäure in 1 n HCl
- Komponente II 20 % NaNO₂ in H₂O
- Komponente III 20 % NaCO₃ in H₂O

Dieses Reagenz diente zum Nachweis His-haltiger Verbindungen.

Lösung I und II wurden zu gleichen Teilen gemischt und mit Lösung III auf das dreifache Volumen aufgefüllt.

d) Ellmann - Reagenz [28]

Eine 10 %ige Lösung von DTNB in Phosphatpuffer pH 8 diente zum Nachweis von Verbindungen mit freier SH - Gruppe.

e) J_2 - Atmosphäre

Das Einstellen der Chromatogramme in J_2 - Atmosphäre diente zur groben Identifizierung von SS und SH - Verbindungen.

Chemikalien

Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch nach den üblichen Methoden gereinigt und getrocknet [111].

p-Nitrophenol wurde aus 3 %iger HCl mit Aktivkohle umkristallisiert.

p-Nitrobenzylchlorid wurde mehrfach unter Aktivkohle Zusatz aus MeOH umkristallisiert.

Alle übrigen Chemikalien wurden in der von den Firmen gelieferten Qualität verwendet.

3.2. Verzeichnis der Literaturpräparate

Die in Tabelle 27 aufgeführten Substanzen wurden nach der angegebenen Literatur synthetisiert. Da die Schmelzpunkte, Drehwerte und Ausbeuten im wesentlichen mit der Literatur übereinstimmen, sind diese Daten nicht aufgeführt.

a) Aminosäurederivate:

Verbindung	Literatur
Ala-OMe x HCl	[115]
Z-Ala	[74]
Z-AlaONp	[116]
L-Boc-AlaONp	[117]
D-Boc-AlaONp	analog [117]
Z-Asp	[74]
Z-Asp-Anhydrid	[118,119]
Z-Asp- α ONB- β DCHA	[120]
Z-Asp- α ONB-BOBut	[120]
Z-Asp- α COOH-BOBut	[120]
Asp-BOBzl	[121]
Z-Asp-BOBzl	[121]
Di-Z-Cys	[122]
Di-Z-Cysdiamid	[123]
Z-Glu	[74,124]
Z-Glu-Anhydrid	[119,125]
Z-Glu- α ONB- γ DCHA	[125]
Z-Glu- α COOH- γ OBu	[125]
Z-Glu- α ONB- γ OBu	[125]
Glu- γ OMe	[126]
Z-Glu- α OMe- γ COOH	[127]
Glu- γ OBzl	analog [121]

Verbindung	Literatur
Z-Glu-γOBzl	analog [121]
Z-Gly	[74]
Z-GlyONp	analog [116]
GlyOCH ₃ x HCl	analog [115]
His-OCH ₃ x 2HCl	[128,129]
Z-His-hydrazid	[130]

b) sonstige Verbindungen:

Verbindung	Literatur
1-Hydroxybenzotriazol	[76,131,132]
p-Nitrobenzylalkohol	[133]
8-Nitro-1-Naphthoesäure	[134,137]
Naphthostyryl	[134,135,136]
Naphthalimid	[138]
o-Dinitrophenyldisulfid	[139]
o-Aminothiophenoldisulfid	[140]
Phthalsäuremonomethylester	[141]
Phthalsäuremonomethylesterchlorid	[142]
Phthalid	[143]
N-Nitroso-N-Methylharnstoff	[142]
Diazomethan in äther. Lösung	[142]

3.3. Arbeitsvorschriften

Z-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid

12 g Cys-diamid $\cdot 2\text{HBr}$ (30 mMol), 18,6 g Z-Gly (80 mMol) werden in 150 ml DMF gelöst, auf -10°C abgekühlt und nacheinander mit 9,2 g HOBt (66 mMol), 8,4 ml TAA (60 mMol) und 12,1 g DCCI (66 mMol) in 30 ml DMF versetzt.

Man läßt das Reaktionsgemisch über Nacht auf Raumtemperatur kommen, saugt den ausgefallenen DC - Harnstoff ab und gießt die DMF - Lösung in Eiswasser.

Die wäßrige Phase wird mit viel EE ausgeschüttelt. Man wäscht die EE - Phase nacheinander mit 5%iger NaHCO_3 , 5%iger Zitronensäure und mit Wasser säurefrei.

Die Reinigungsschritte müssen schnell erfolgen, da das Produkt sehr schlecht in EE löslich ist und zunehmend ausfällt.

Das aus dem EE fein ausgefallene Produkt wird, nachdem es vollständig getrocknet ist, zur weiteren Reinigung mit EE ausgekocht.

Ausbeute: 12,3 g (65%) Fp: 165°C

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -93,9$ (c = 1; DMF)

DC: I,II,III,IV einheitlich

$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{N}_6\text{S}_2$ (620,68)

ber.	C	50,31	H	5,16	N	13,54
------	---	-------	---	------	---	-------

gef.	C	50,51	H	5,02	N	13,54
------	---	-------	---	------	---	-------

Gly-Cys-NH₂ - Disulfid x 2HBr

Zu einer Suspension von 12,5 g Z-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid

(20 mmol) in 80 ml Eisessig gibt man 40 ml HBr (33%ig in Hac); es tritt sofort Lösung ein. Nach 5 - 10 Minuten Rühren bei Raumtemperatur beginnt das Reaktionsprodukt auszufallen. Der Niederschlag wird nach 60 Minuten abgesaugt und mit viel Äther nachgewaschen.

Zur Reinigung kristallisiert man aus MeOH/Äther um.

Ausbeute: 9,4 g (90%) Fp: 221°C unter Zers.

DC: I,III,IV einheitlich

$C_{10}H_{20}O_4N_6S_2 \times 2HBr$ (514,3)

Z-Gly-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid

5,2 g Gly-Cys-NH₂ - Disulfid x 2HBr (10 mmol) und 6,4 g Z-Gly (30 mmol) werden in 100 ml DMF gelöst, auf -20°C abgekühlt und nacheinander mit 4,5 g HOBt (33 mmol), 2,8 ml TAA und 6,2 g DCCI (30 mmol) versetzt.

Man läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren; anschließend wird der ausgefallene DC- Harnstoff abfiltriert und das Filtrat in 1 L Eiswasser gegossen. Nach 60 min. Stehen im Eisbad scheidet sich eine feinkristalline Masse aus, die nach dem Trocknen zur weiteren Reinigung nacheinander mit EE und MeOH ausgekocht wird.

Ausbeute: 5,0 g (69%) Fp: 224 - 226°C unter Zers.

$[\alpha]_D^{24} = -83,2$ (c=1; DMF)

DC: I,II,III,IV einheitlich

$C_{30}H_{38}O_{10}N_8S_2$ (734,8)

ber. C 49,03 H 5,21 N 15,25

gef. C 48,77 H 5,02 N 15,21

Gly-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid x 2HBr

7,4 g Z-Gly-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid (10 mMol) werden in 40 ml Eisessig suspensiert; nach Zugabe von 20 ml HBr (33%ig in HAc) tritt sofort Lösung ein und fast gleichzeitig beginnt das Reaktionsprodukt auszufallen.

Der Niederschlag wird nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur abgesaugt, mit viel Äther nachgewaschen und aus MeOH/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 6,0 g (95%)

Fp: 186 - 190°C u. Zers.

DC: I,II,III,IV einheitlich

C₁₄H₂₆O₆N₈S₂ x 2HBr

Z-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid

3,2 g Gly-Gly-Cys - Disulfid (5 mMol) und 5,2 g Z-Ala-ONp (15 mMol) werden in 100 ml DMF gelöst und auf 0°C abgekühlt; dann setzt man 1,4 ml TAA (10 mMol) zu und läßt 8 h bei 0°C rühren. Nach Stehen über Nacht bei Raumtemperatur läßt sich chromatographisch aus dem Reaktionsgemisch keine freie NH₂-Gruppe mehr nachweisen.

Die DMF - Lösung wird in 300 ml kalten Äther getropft; nach kurzem Stehen setzt Kristallisation ein.

Zur Reinigung wird zweimal aus DMF/Äther umkristallisiert und mehrfach mit EE ausgekocht.

Ausbeute: 3,9 g (88%)

Fp: 178 - 180°C

[α]_D²⁴ = -71,4 (c=1; DMF)

DC: II,III,IV einheitlich, I leichter Schatten am Start

C₃₆H₄₈O₁₂N₁₀S₂ (877,0)

ber. C 49,30 H 5,52 N 15,97

gef. C 49,00 H 5,45 N 15,72

Aminosäureanalyse:	Ala	Gly	Cys
ber.	1.00	2.00	1.00
gef.	1.02	2.00	n.b.

Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid x 2HBr

8,8 g Z-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid (10 mMol) werden in 100 ml 2 n HBr in Eisessig 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Ausgangsprodukt löst sich sofort und nach ca 10 min beginnt das Reaktionsprodukt auszufallen.

Nach Absaugen und Nachwaschen mit Äther wird aus MeOH/Äther umkristallisiert.

Ausbeut: 5.1 g (83%) Fp: 210° C Aufschäumen
222° C Zersetzung

DC: II,III,IV einheitlich, I leichter Chlor - Tolidin
positiver Schatten läuft vor.

C₂₀H₃₆O₈N₁₀S₂ x 2HBr (768,9)

Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid

Aus 12 g Z-His-Hydrazid (40 mMol) wird wie üblich das Azid hergestellt. Die das Azid enthaltende EE - Phase filtriert man zu einer Lösung von 6.14 g Ala-Gly-Gly-CysNH₂ Disulfid (10 mMol) in 100 ml DMF und 2,8 ml TÄA.

Der EE wird im Vakuum bei Raumtemperatur abgezogen und die Reaktionslösung 48 h gerührt.

Während dieser Zeit fällt der größte Teil des Reaktionsprodukts als weißer Niederschlag aus, der nach dem Absaugen zur Entfernung eventuell mitausgefallener Salze mehrfach mit Wasser gewaschen wird.

Zur Reinigung wird wiederholt aus DMF/Äther und MeOH/Äther umkristallisiert.

Die Reaktionslösung wird zur Vervollständigung der Ausbeute mit viel Äther versetzt, und der resultierende Niederschlag wird ebenfalls nach Behandlung mit Wasser mehrfach umkristallisiert.

Ausbeute: 3,7 g (32 %) Fp: 207° C

$[\alpha]_D^{24} = -49,5$ (c=1; DMF)

DC: I, IV einheitlich, II, III leichter, ebenfalls Pauly positiver Fleck (vermutlich Z-His-Hydrazid)

$C_{48}H_{62}N_{16}O_{14}S_2$ (1151,2)

ber.	C	50,07	H	5,43	N	19,47
gef.	C	49,43	H	5,34	N	18,67

Aminosäureanalyse:	His	Ala	Gly	Cys
ber.	1,00	1,00	2,00	1,00
gef.	0,92	1,00	2,03	n.b.

Z-His-Ala-Gly-Gly-Cys-NH₂

Reduktion des Disulfids

1 g Disulfid wird über Nacht mit 10 ml Mercaptoäthanol versetzt. Nach vollständigem Lösen bildet sich eine Gallerte. Man gießt in Äther und rührt einige Zeit bei Raumtemperatur, es bildet sich ein feiner kristalliner Niederschlag.

Nach Absaugen wird mehrfach aus MeOH/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: fast quantitativ Fp: 163-65° C

DC: I, II, IV einheitlich bis auf eine Spur Disulfid.

$C_{24}H_{32}N_8O_7S$ (576.7)

ber.	C	49,98	H	5,59	N	19,43
gef.	C	49,04	H	5,40	N	18,85

SH - Gehalt: 93%

Z-Asp(BOtBut)-GlyOCH₃

16,2 g Z-Asp(BOtBut) (50 mMol) werden mit 7,0 g (50 mMol) GlyOCH₃ x HCl (50 mMol) und 7,5 g HOBT (55 mMol) in 200 ml DMF gelöst.

Nach Abkühlen auf - 10° C versetzt man nacheinander mit 7,0 ml TAA (50 mMol) und 11,3 g DCCI (55 mMol). Der Ansatz wird langsam auf 25° C erwärmt und über Nacht gerührt. Der ausgefallene DC - Harnstoff wird abgesaugt und das Filtrat in Eiswasser gegossen. Das ausgeschiedene Öl wird in EE aufgenommen und nacheinander zur Entfernung der Ausgangsverbindungen mit 5 %iger NaHCO₃, 5 %iger Zitronensäure und Wasser gewaschen.

Nach Trocknen über Na₂SO₄ wird die EE - Phase eingeeengt und es bleibt ein farbloses von vielen Kristallen durchsetztes Öl zurück.

Ausbeute: 14,0 g (71%)

DC: I,II,III,V,VI einheitlich

Nach Bestätigung der Einheitlichkeit durch die Chromatogramme wurde wegen der öligen Konsistenz der Verbindung auf weitere Analysen verzichtet.

C₁₉H₂₇O₇N₂ (395,5)

Asp(BOtBut)-GlyOCH₃ x CH₃COOH

14,0 g des öligen Dipeptids werden in 150 ml DMF gelöst, mit 1 ml Eisessig versetzt und unter PtO₂ - Katalyse hydriert. Nach beendeter H₂ - Aufnahme wird die Reaktionslösung eingeeengt, es bleibt ein helles Öl zurück, das nach Überprüfen der Einheitlichkeit sofort weiter eingesetzt wird.

Ausbeut: fast quantitativ

DC: I,II,V,VI einheitlich

C₁₃H₂₄O₇N₂ (320,3)

Z-Ala-Asp(BOtBut)-GlyOCH₃

12,8 g Asp(BOtBut)-GlyOCH₃ (40mMol) werden mit 9 g Z-Ala (40 mMol) und 5,4 HOBt (44 mMol) in 150 ml DMF gelöst, und nach Abkühlen im Kältebad mit 5,6 ml TAA und 8,8 g DCCI versetzt.

Der Ansatz wird über Nacht gerührt und anschließend vom ausgefallenen DC - Harnstoff abgetrennt.

Die Reaktionslösung gibt man in 300 ml gesätt. NaCl - Lösung, schüttelt mit EE aus und reinigt die EE - Phase wie üblich. Nach Trocknen wird das Lösungsmittel vollständig abgezogen, der Rückstand in Äther aufgenommen und langsam mit PE gefällt. Zur Reinigung wird ein weiteres Mal aus Äther/PE umkristallisiert.

Ausbeute: 12,7 g (68%) Fp: 86°C

$[\alpha]_D^{24} = -23,7$ (c=1; DMF)

DC: I,III,V.VI einheitlich

C₂₂H₃₁O₈N₃ (465,5)

ber.	C	56,89	H	6,67	N	9,04
gef.	C	57,01	H	6,62	N	8,99

Ala-Asp(BOtBut)-GlyOCH₃ · x CH₃COOH

10 g geschütztes Tripeptid werden unter Zugabe äquimolarer Mengen Essigsäure in 200 ml MeOH gelöst und katalytisch hydriert. Nach beendeter H₂ - Aufnahme wird vom Katalysator abgetrennt und eingeeengt. Das Reaktionsprodukt wird in Äther aufgenommen und mit PE gefällt. Der in der Lösung fein verteilte kristalline Niederschlag ist sehr hygroskopisch und blieb bei verschiedenen Versuchen nach dem Absaugen immer als Öl zurück, so daß das Produkt am günstigsten gleich weiter verarbeitet wird.

Ausbeut: fast quantitativ

DC: Das zurückbleibende Öl war in den üblichen Laufmitteln chromatographisch einheitlich.

$C_{16}H_{29}N_3O_8$ (391,4)

Z-His-Ala-Asp(BOtBut)-GlyOCH₃

Vorbereitung der Carboxylkomponent:

4,6 g Z-His-Hydrazid (15 mMol) werden in 30 ml 2 n HCl gelöst und bei $-5^{\circ}C$ mit einer vorgekühlten Lösung von 1,1 g $NaNO_2$ in Wasser versetzt.

Nach 5 min Reaktionszeit werden 100 ml EE und 30 ml 50 %ige K_2CO_3 - Lösung zugegeben, gründlich geschüttelt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird noch zweimal mit wenig kaltem EE ausgeschüttelt. Die vereinigten EE - Phasen trocknet man kurz im Kältebad über Natriumsulfat und filtriert die Azid haltige Lösung in die vorbereitete Aminkomponente.

Aminkomponente:

3,91 g Ala-Asp(BOtBut)-GlyOCH₃ x CH_3COOH (10 mMol) werden unter Zusatz von 1,4 ml TAA (10 mMol) in 100 ml DMF gelöst und abgekühlt.

Nach Zugabe der Carboxylkomponente wird 24 h bei $0^{\circ}C$ und 24 h bei Raumtemperatur gerührt.

Nach beendeter Reaktion zieht man den EE im Vakuum ab und engt die DMF - Lösung ein. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, vom Feststoff filtriert und mit PE gefällt.

Ausbeute: 5.0 g (83%) Fp: $90-95^{\circ}C$ (Z)

$[\alpha]_D^{24} = -10,8$ (c=1; DMF)

DC: I,II,III,V einheitlich

$C_{28}H_{38}N_6O_9$ (602,7)

ber.	C	55,80	H	6,36	N	13,95
------	---	-------	---	------	---	-------

gef.	C	55,68	H	6,44	N	13,49
------	---	-------	---	------	---	-------

Aminosäureanalyse:	His	Ala	Asp	Gly
ber.	1,00	1,00	1,00	1,00
gef.	0,95	0,99	0,98	1,00

Z-Asp(BOtBut)-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid

8,1 g Z-Asp(BOtBut) (25 mMol) und 5,2 g Gly-Cys-NH₂ - Disulfid (10 mMol) werden in 100 ml DMF gelöst, auf -20° C abgekühlt und nacheinander mit 3,0 g HOBT (22 mMol), 2,8 ml TAA und 4,5 g DCCI (22 mMol) versetzt.

Nach 6 h Rühren, bei langsam auf Raumtemperatur ansteigender Temperatur, wird der ausgefallene DC - Harnstoff abfiltriert und der Ansatz wie üblich aufgearbeitet.

Läßt man den Ansatz 8 - 10 h Rühren, so kommt es unter Braunfärbung zu erheblichen Nebenreaktionen.

Die EE - Phase wird eingeeengt, das Reaktionsprodukt fällt dabei aus. Nach Absaugen wird nochmal mit PE nachgefällt. Das Endprodukt wird in viel EE unter Zusatz von möglichst wenig MeOH gelöst und mit wenig Äther gefällt.

Ausbeute: 6,3 g (66%) Fp: 189-91° C

$[\alpha]_D^{24} = -86,3$ (c=1; DMF)

DC: I,III,IV einheitlich

C₄₂H₅₈N₈O₁₄S₂ (963,1)

ber.	C	52,38	H	6,07	N	11,64
gef.	C	51,80	H	5,92	N	11,60

Z-Glu(γOtBut)-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid

Der Ansatz wird analog dem Asp - Ansatz durchgeführt. Statt Z-Asp(BOtBut) werden äquimolare Mengen (8,4 g) des entsprechenden Glutaminsäureesters eingesetzt.

Ausbeute: 8,2 g (63%) Fp: 189 - 90°C

$[\alpha]_D^{24} = -74,7$ (c=1; DMF)

DC: I,IV einheitlich; II,III zwei Banden

$C_{44}H_{62}N_8O_{14}S_2$ (991,2)

ber.	C	53,32	H	6,31	N	11,31
------	---	-------	---	------	---	-------

gef.	C	52,79	H	6,18	N	11,46
------	---	-------	---	------	---	-------

Glu-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid x 2HBr

5 g Z-Glu(γOtBut)-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid (5 mMol)

werden in 30 ml HAC suspensiert, mit 20 ml HBr in Eisessig versetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend engt man zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in Äther auf und rührt 30 min. Nach Absaugen kristallisiert man aus MeOH/Äther um.

Ausbeute: 3.3 g (83%)

Fp: 191° C Aufschäumen
197° C Schmelzen
unter Zersetzung.

DC: I,II,III,IV einheitlich

$C_{20}H_{34}N_8O_{10}S_2$ x 2 HBr (707,9)

Asp-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid

5 g Z-Asp(βOtBut)-Gly-Cys-NH₂ - Disulfid werden in 30 ml HAC und 20 ml HBr (33 %ig in HAC) versetzt und 90 min bei Raumtemperatur gerührt.

Der Reaktionsansatz wird bei niedriger Temperatur zur Trockne einrotiert, der zurückbleibende Feststoff in MeOH gelöst und mit Äther ausgefällt.

Man kristallisiert das Reaktionsprodukt mehrere Male aus MeOH/Äther um.

Ausbeute: 3,5 g (90 %)

Fp: 219° C

DC: I,II,III,IV einheitlich $[\alpha]_D^{24} = -100,7$ ($c=1$; DMF)
 $C_{18}H_{30}N_8O_{10}S_2 \times 2 HBr$

Z-His-AlaOCH₃

1) Vorbereitung der Carboxylkomponente

33 g Z-His-Hydrazid (110 mMol) werden in 150 ml 2 n HCl gelöst und auf $-5^{\circ}C$ abgekühlt. Zu dieser Lösung tropft man 7,7 g $NaNO_2$, das zuvor in 50 ml Wasser gelöst wurde. Fünf Minuten nach beendeter Zugabe wird die Reaktionslösung mit 300 ml kaltem EE überschichtet, und man setzt auf einmal 200 ml 50 %ige K_2CO_3 - Lösung zu. Nach Abtrennen der EE - Phase extrahiert man das Azid noch zweimal mit je 200 ml EE und trocknet die vereinigten EE Phasen kurz im Eisbad über Natriumsulfat.

2) Vorbereitung der Aminkomponente

14 g $AlaOCH_3 \times HCl$ (0.1 Mol) werden in 150 ml DMF gelöst, mit 14 ml TAA neutralisiert und auf $0^{\circ}C$ abgekühlt.

Kupplung :

1) wird in 2) filtriert, da die Aminkomponente und das Reaktionsprodukt schlecht in EE löslich sind, wird nach einigen Stunden der zugesetzte EE bei Raumtemperatur im Vakuum abgezogen und noch weitere 50 ml DMF zugesetzt. Nach 48 h Rühren filtriert man den weißen Niederschlag ab, engt das Filtrat ein und versetzt mit 2 l Äther. Nach einigen Stunden im Eisbad setzt Kristallisation ein. Zur weiteren Reinigung wird noch zweimal aus wenig EtOH abs. umkristallisiert.

Ausbeute: 30 g (80%) Fp: $132^{\circ}C$

$[\alpha]_D^{24} = -16,2$ ($c=1$; DMF)

DC: I,II,III,IV einheitlich

$C_{18}H_{22}O_5N_4$ (374,4)

ber.	C	57,74	H	5,92	N	14,96
gef.	C	56,83	H	5,93	N	14,84

Z-His-Ala-Hydrazid

18,7 g Z-His-AlaOCH₃ (0,05 Mol) werden in möglichst wenig MeOH gelöst und nach Zugabe von 26 ml Hydrazinhydrat über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Der größte Teil des Produkts fällt während der Reaktion aus, der Rest wird mit Äther ausgefällt. Zur Reinigung kristallisiert man aus wenig ETOH um.

Ausbeute: 16.6 g (89%) Fp: 178° C

$[\alpha]_D^{24} = -5.4$ (c=1; DMF)

DC: I,II,III einheitlich

C₁₇H₂₂N₆O₄ (374,4)

ber.	C	54,55	H	5,88	N	22,40
gef.	C	54,73	H	6,05	N	22,33

Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ Disulfid

3,74 g Z-His-Ala-Hydrazid (10 mMol) werden in 10 ml HCl/Dioxan (4n) und 40 ml DMF gelöst und auf -40° C abgekühlt.

Man setzt 1,62 ml iso-Amylnitrit (12 mMol) zu und rührt 30 min bei - 40° C. Danach wird der Reaktionsansatz mit 5,6 ml TÄA (40 mMol), das zuvor mit 10 ml DMF versetzt wurde, neutralisiert und sofort mit einer vorgekühlten Lösung von 2,23 g Asp-Gly-CysNH₂ - Disulfid (3,3 mMol) in 30 ml DMF unter Zusatz von 1,84 ml TÄA (13,2 mMol) versetzt.

Man läßt den Reaktionsansatz 2 h bei - 40° C, je 12 h bei - 20° C und 0° C und einen Tag bei Raumtemperatur rühren.

Durch gelegentliche tropfenweise Zugabe von TÄA wird der pH zwischen 7,5 und 8,0 gehalten. Nach 24 h ist im Chromatogramm keine Aminkomponente mehr nachweisbar.

Zur Aufarbeitung kühlt man auf -30°C ab, um die Ausfällung des Salzes zu vervollständigen. Nach Trennen vom ausgefallenen Salz wird das Reaktionsprodukt mit viel EE aus der Lösung gefällt. Die im Chromatogramm zahlreichen His - haltigen Nebenprodukte bleiben neben weiteren Reaktionsprodukten in Lösung. Zur Vervollständigung der Ausbeute fällt man nach Einengen mit Äther, löst die Ätherfällung in wenig DMF und setzt nochmals EE zu. Die vereinigten EE - Fällungen werden mit MeOH ausgekocht, wegen der schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln konnte das Produkt auf diesem Weg nicht weiter gereinigt werden.

Wegen der Löslichkeitsschwierigkeiten wurde das Pentapeptid Disulfid in das Hydrochlorid umgewandelt.

Das schon mehrfach durch Auskochen mit verschiedenen Lösungsmitteln gereinigte Produkt wird mit 4 n HCl in Dioxan übergossen, 10 min bei RT gerührt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das entstandene Hydrochlorid war aus MeOH/Äther umzukristallisieren.

Ausbeute: 2,00 g (45 %) Fp: 157°C (Zersetzung)

$[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -73,5$ (c=1; DMF)

DC: I, II, III, IV bis auf leichten Pauly positiven Schatten einheitlich.

$\text{C}_{52}\text{H}_{66}\text{N}_{16}\text{O}_{18}\text{S} \cdot 2 \text{HCl}$ (1340,3)

ber.	C	46,60	H	5,11	N	16,72
gef.	C	46,91	H	5,08	N	16,06

Aminosäureanalyse:	His	Ala	Asp	Gly	Cys
ber.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
gef.	1,09	1,01	0,96	1,00	1,00

Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂

Reduktion des Disulfids:

1 g Disulfid wird in 5 ml DMF unter Erhitzen gelöst, danach setzt man 10 ml Mercaptoäthanol zu und rührt 24 h bei 40°C, es bildet sich im Verlauf der Reaktion eine Gallerte. Zur Vervollständigung der Reduktion setzt man nochmals Mercaptoäthanol zu und erhitzt eine Stunde auf 80°C.

Beim Abkühlen fällt das Reaktionsprodukt als Gallerte an. Nach Zusatz von Äther und längerem Stehen im Eisbad wird abgesaugt und mehrfach unter Zusatz von wenig Wasser aus MeOH umkristallisiert.

Ausbeute: 300 mg Fp: 181°C

DC I,II,III einheitlich

C₂₆H₃₄N₈O₉S (634,7)

ber.	C	49,21	H	5,40	N	17,65
------	---	-------	---	------	---	-------

gef.	C	49,00	H	5,45	N	16,40
------	---	-------	---	------	---	-------

SH - Gehalt: 94%

Z-His-Ala-Glu-Gly-CysNH₂ - Disulfid

Die Umsetzung erfolgte analog dem entsprechenden Asp - Pentapeptid.

Die Reinigung erfolgte durch mehrfaches Auskochen mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln. Selbst in heißem DMF ist das Reaktionsprodukt unlöslich.

Die Umwandlung in das entsprechende Hydrochlorid brachte eine geringe Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften.

[α]_D²⁵ = - 51,4 (c=1; DMF)

Fp: 180 °C (unter Zersetzung)

DC: I,II,III leichter Pauly positiver Schatten.

C₅₄H₇₂N₁₆S₂O₁₈Cl₂ (1367,4)

ber.	C	47,50	H	5,27	N	16,38
------	---	-------	---	------	---	-------

gef.	C	47,68	H	4,98	N	15,67
------	---	-------	---	------	---	-------

Aminosäureanalyse:	His	Ala	Glu	Gly	Cys
ber.	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
gef.	1,05	1,08	0,99	1,00	n.b.

Reduktion des Disulfids

1 g Disulfid wird mit 10 ml Mercaptoäthanol übergossen und 3 h unter Rückfluß gekocht. Die beim Abkühlen entstehende Gallerte wird in Äther gegossen und das ausfallende Produkt abgesaugt.

Auch die reduzierte Verbindung war in allen üblichen Lösungsmitteln und Wasser nahezu unlöslich. Da sie nach Lösungsmittelzusatz stark aufquoll war eine Reinigung unmöglich.

Wegen der ungünstigen Lösungseigenschaften war die Verbindung für die geplanten Messungen unbrauchbar.

Z-Glu(YOBz)-GlyOCH₃

7,0 g GlyOCH₃ x HCl (50mMol), 17,85 g Z-Glu(YOBz) und 7,5 g HOBt werden in 200 ml DMF gelöst, in der Kälte mit 7,0 ml TAA und 11,3 g DCCI versetzt, über Nacht gerührt und nach Abfiltrieren des ausgefallenen DC - Harnstoffs in 1 L Eiswasser gegossen.

Nach Ausschütteln mit EE reinigt man wie üblich, engt ein und fällt mit PE. Zur Reinigung wird mehrfach aus EE/PE umkristallisiert.

Ausbeute: 16,5 g (75%) Fp: 100 - 03° C

DC: I, III, IV einheitlich

C₂₃H₂₆N₂O₇ (442,5)

[α]_D²⁴ = - 5,3 (c=1; DMF)

ber.	C	62,43	H	5,92	N	6,33
gef.	C	62,28	H	5,85	N	6,30

Glu-GlyOCH₃ x CH₃COOH

4,4 g geschütztes Dipeptid werden in 200 ml MeOH gelöst und nach Katalysatorzugabe hydriert. Um Nebenreaktionen zu verhindern wird dem Ansatz eine äquimolare Menge Essigsäure zugesetzt.

Nach beendeter Wasserstoffaufnahme filtriert man vom Katalysator ab und engt die Lösung ein. Das zurückbleibende Öl wird in MeOH gelöst und mit Äther gefällt.

Ausbeute: 2,3 g (83%)

Fp: 115-17° C

$[\alpha]_D^{24} = -20,35$ (c=1; DMF)

DC: I,II,III einheitlich

C₁₀H₁₈O₇N₂ (278,0)

Z-Asp(BOBz)-GlyOCH₃

Der Ansatz und die Aufarbeitung erfolgten in gleicher Weise wie bei der analogen Glu - Verbindung.

Das Reaktionsprodukt wurde aus wenig EE umkristallisiert.

Ausbeute: 17,1 g (79%)

Fp: 118°C

$[\alpha]_D^{24} = -15,3$ (c=1; DMF)

DC: I,III,IV einheitlich

C₂₂H₂₄N₂O₇ (428,5)

ber.	C	61,66	H	5,65	N	6,54
------	---	-------	---	------	---	------

gef.	C	61,53	H	5,40	N	6,69
------	---	-------	---	------	---	------

Asp-GlyOCH₃ x CH₃COOH

Die Hydrierung verläuft ebenfalls analog der Glu - Verbindung und mit gleicher Ausbeute.

Fp: 134 - 36° C

C₉H₁₆O₇N₂ (264,0)

Z-His-Ala-Asp-GlyOCH₃ x HCl

3,74 g Z-His-Ala-Hydrazid (10 mMol) werden in 50 ml DMF gelöst und nach Zugabe von 10 ml HCl in Dioxan (4n) bei - 40° C mit 1,62 ml Isoamylnitrit (12 mMol) versetzt. Nach 30 min neutralisiert man langsam mit 5,6 ml TÄA (40 mMol), dabei fällt ein weißer Niederschlag aus, wahrscheinlich handelt es sich um Triäthylammoniumchlorid. Zu der so vorbereiteten Carboxylkomponente gibt man sofort nach der Neutralisation 2,64 g Asp-GlyOCH₃ x CH₃COOH (10 mMol), das man zuvor in 40 ml DMF löst und mit 2,8 ml TÄA versetzt.

Nach 2 h Rühren bei - 30° C rührt man je 12 h bei - 20° C und bei 0° C und läßt anschließend langsam auf Raumtemperatur kommen.

Nach Abfiltrieren vom Salz wird das Reaktionsprodukt mit Äther gefällt. Das Rohprodukt wird mehrfach aus MeOH umkristallisiert. Da das Peptid in MeOH stark aufquillt ist der Reinigungseffekt nicht sehr groß, so daß zur Entfernung der ebenfalls Pauly positiven Nebenprodukte mehrere Reinigungsschritte notwendig sind.

Auch bei dieser Verbindung erweist es sich als günstig, sie in das Hydrochlorid zu überführen. Es wird wie zuvor beschrieben verfahren; das Hydrochlorid ist gut in MeOH löslich, ohne eine Gallerte zu bilden und löst sich auch im Puffer vom pH 7.00.

Ausbeute: 2,9 g (50%) Fp : 160 - 61° C

$[\alpha]_D^{24} = - 22,2$ (c=1; DMF)

DC: I, II, IV einheitlich

C₂₄H₃₀N₆O₉Cl (583,01)

ber.	C	49,44	H	5,36	N	14,41
gef.	C	49,24	H	5,29	N	13,84

Aminosäureanalyse:	His	Ala	Glu	Gly
ber.	1,00	1,00	1,00	1,00
gef.	0,95	1,02	1,00	1,00

o-Chlormethylbenzoesäure

300 g Toluylsäure (2,2 Mol) und 249 g Sulfurylchlorid (1,8 Mol) werden in 1,2 l CCl_4 gelöst und anschließend unter stündlicher Zugabe weniger Milligramm Azo-bis-Iso-butyronitril als Kettenstarter 10 h unter Rückfluß gekocht. Beim Abkühlen der Reaktionslösung setzt sofort Kristallisation ein. Der Niederschlag wird abgesaugt und aus wenig CCl_4 umkristallisiert.

Ausbeute: 239 g (65%)

Fp: 125°C

DC: I,III,IV einheitlich

S-Benzyl-o-Carboxylthiuronium Salz

170 g o-Chlormethylbenzoesäure (1,0 Mol) und 87 g Thioharnstoff (1,1 Mol) werden in 1 l EtOH 6 h unter Rückfluß gekocht. Die Reaktionslösung engt man bis zur beginnenden Kristallisation ein und läßt über Nacht stehen. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung zur Verseifung eingesetzt.

Ausbeute: 160 g (78%)

Fp: 188°C

o-Mercaptomethylbenzoesäure

160 g Thiuroniumsalz werden mit 210 ml 5 n NaOH 2 h unter Rückfluß gekocht. Beim Ansäuern mit 2 n HCl fällt das Reaktionsprodukt aus.

Zur Reinigung wird aus $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ umkristallisiert.

Ausbeute: 120 g (90%)

Fp: 131°C

DC: I,II,III,IV einheitlich

$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2\text{S}$ (168,2)

ber. C 57,14

H 4,76

SH-Gehalt: 94%

gef. C 57,65

H 4,81

o-Mercaptomethylbenzoesäure - Disulfid

70 g Mercaptomethylbenzoesäure (0,47 Mol) und 80 g FeCl_3 werden unter Erwärmen in 2 l EtOH gelöst, der Lösung setzt man 5 ml HCl konz. zu und kocht eine Stunde unter Rückfluß.

Nach Abkühlen der Lösung fällt das Disulfid bei H_2O - Zugabe aus. Die Umkristallisation erfolgt aus $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$.

Ausbeute: 58 g (84%) Fp: 196°C

DC: I, II, III einheitlich

$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{S}_2$ (336)

o- Mercaptomethylbenzoesäureamid - Disulfid

5 g o-Mercaptomethylbenzoesäure - Disulfid (15mMol) werden in 100 ml CHCl_3 unter Zusatz von 4 ml TAA gelöst.

Man tropft langsam 3,1 ml Chlorameisensäureäthylester (33 mMol) zu und rührt 45 min bei Raumtemperatur. Anschließend leitet man 45 min NH_3 in das Reaktionsgemisch ein. Es bildet sich sofort ein weißer Niederschlag. Nach beendeter Reaktion wird das Lösungsmittel abrotiert, der Niederschlag abgesaugt, 3 mal mit 0,5 m Na_2CO_3 - Lösung gewaschen und mit Wasser neutral gewaschen.

Nach dem Trocknen wird aus $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ umkristallisiert.

Ausbeute: 2,1 g (41%) Fp: 212°C

DC: I, IV, V einheitlich

$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (338)

o-S-Acetylmercaptomethyl-benzoesäureamid

0,2 g Mercaptomethylbenzoesäureamid - Disulfid werden in einer Mischung von 20 ml Eisessig und 20 ml Acetanhydrid

suspensiert und mit 1,5 g Zn - Staub versetzt. Man läßt die Reaktionslösung eine Stunde bei 40° C rühren, filtriert vom überschüssigen Zink ab und engt die Lösung zur Trockne ein. Der Rückstand wird in EE aufgenommen und zur Entfernung des Zn - Acetats mehrfach mit H₂O ausgeschüttelt. Die EE - Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, der EE abgezogen und der Rückstand in Äther aufgenommen. Nach dem Absaugen wäscht man gründlich mit Äther nach.

Ausbeute: 110 mg

Fp: 131° C

DC: I,II einheitlich

C₁₀H₁₁O₂NS (209,3)

ber.	C	57,39	H	5,29	N	6,69
------	---	-------	---	------	---	------

gef.	C	57,83	H	5,18	N	6,86
------	---	-------	---	------	---	------

8-Mercapto-1-Naphthoesäure

1 g Naphthostyryl (6mMol) wird 30 min in 10 %iger NaOH unter Rückfluß gekocht, anschließend werden 415 mg NaNO₂, das zuvor in wenig Wasser gelöst wurde, der abgekühlten Lösung zugesetzt. Dieses Gemisch läßt man unter starkem Rühren und Kühlen in 5 ml 6 n HCl einfließen.

1 g Kaliumäthylxanthogenat (6,6 mMol) wird in 20 ml HCl gelöst und auf 70° C erhitzt. Zu dieser Lösung tropft man unter heftigem Rühren die diazotierte Lösung. Nach beendeter Zugabe läßt man eine weitere Stunde rühren und schüttelt anschließend die Reaktionlösung mit EE aus.

Nach Trocknen und Abziehen des Lösungsmittels bleibt ein gelbbraunes Öl zurück, das in MeOH aufgenommen wird und nach Reinigung mit Aktivkohle mit Wasser gefällt wird.

Ausbeute: 400 mg

Fp: 128° C

C₁₄H₁₂O₄S (276,2)

Die Verbindung wurde durch IR- und NMR - Spektren charakterisiert.

Verseifung

Das Xanthogenat wird in methanolischer KOH gelöst und eine Stunde unter Rückfluß gekocht, beim Ansäuern fällt ein gelbbrauner Feststoff aus. Nach Umkristallisieren aus MeOH/H₂O wird zur weiteren Reinigung aus heißem PE umkristallisiert.

Ausbeute: 100 mg Fp: 154°C

C₁₁H₆OS (186,2)

N-(o-Carbomethoxybenzoyl)-o-Aminothiophenol - Disulfid

Zu einer Lösung von 2,5 g o-Aminothiophenol - Disulfid (10 mmol) in 15 ml CHCl₃ und 5 ml Pyridin tropft man unter Kühlung 6 g Phthalsäuremonomethylestersäurechlorid (30 mmol), das zuvor in 10 ml CHCl₃ gelöst wurde. Nach beendeter Zugabe läßt man den Ansatz über Nacht auf Raumtemperatur kommen.

Zur Aufarbeitung schüttelt man nacheinander mit 5 %iger NaHCO₃ - Lösung, 5 %iger Zitronensäure und mehrmals mit Wasser aus. Man trocknet über Na₂SO₄, engt ein, nimmt das zurückbleibende Öl in EE auf und fällt langsam mit PE. Es wird noch zweimal aus EE/PE umkristallisiert. Das Produkt fällt leicht als Öl an und kristallisiert nur sehr langsam durch.

Ausbeute: 1,8 g (31,4%) Fp: 125°C

DC: I, II, III, IV einheitlich

C₃₀H₂₄O₆N₂S₂ (572,7)

ber. C 62,92 H 4,22 N 4,89

gef. C 62,90 H 4,19 N 4,85

N-(o-Carbomethoxybenzoyl)-o-Aminothiophenol

Reduktion des Disulfids:

1 g Disulfid wird in 10 ml Mercaptoäthanol gelöst und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Anschließend gießt man die Reaktionslösung in 100 ml Eiswasser, saugt nach möglichst kurzem Stehen ab (nach einigen Stunden ist bereits ein großer Teil des Esters hydrolysiert), trocknet das Produkt und kristallisiert aus EE/PE um.

Ausbeute: 800 mg (80%) Fp: 114° C

DC: I, II, IV einheitlich

C₁₅H₁₃NS (287,4)

SH - Gehalt: 96 %

Methylierung der SH - Gruppe

Die freie SH - Verbindung wird in wenig MeOH gelöst und bei Raumtemperatur solange mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt bis die Gelbfärbung bestehen bleibt. Der Reaktionsverlauf wird mit Ellmann - Reagenz überprüft. Bei beständiger Gelbfärbung ist kein SH mehr nachweisbar. Zur Entfernung des überschüssigen Diazomethans wird der Reaktionsansatz in einem offenen Gefäß über Nacht gerührt. Anschließend zieht man das Lösungsmittel ab, nimmt den Rückstand in EE auf und fällt mit PE.

Ausbeute: fast quantitativ Fp: 150 - 52° C

DC: I, III, IV einheitlich

C₁₆H₁₅O₃NS (301,4)

Di-Phthalyl-(o-Methylester)-Cystindiamid

4 g Cystindiamid x HBr (10 mMol) werden in 100 ml CHCl_3 suspensiert und unter starkem Rühren mit 2,8 ml TÄÄ versetzt. Zum Abfangen der während der Reaktion entstehenden HCl werden 4 ml Pyridin zugesetzt. In diese Suspension tropft man unter Kühlung 5,9 g Phthalsäuremonesterchlorid (30 mMol). Während der Reaktion kommt es zu leichter Gelbfärbung des Ansatzes, und es tritt fast vollständige Lösung ein. Man läßt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Zur Reinigung schüttelt man mit NaHCO_3 - Lösung und mit Zitronensäure aus und wäscht mit Wasser neutral. Nach Trocknen über Natriumsulfat engt man ein und nimmt die zurückbleibende Gallerte in wenig EE auf. Das Produkt wird durch langsame PE - Zugabe gefällt. Da die Kristallisation Schwierigkeiten bereitet, und das Produkt als Gallerte immer wieder Verunreinigungen aus der Mutterlauge mitreißt, muß mehrfach umkristallisiert werden.

Ausbeute: 0,5 g Fp: 176°C
DC: I,II,III einheitlich $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -230,4$ (c=1; DMF)
 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_8\text{N}_4\text{S}_2$ (562,6)

ber.	C	51,23	H	4,66	N	9,96
gef.	C	51,24	H	4,41	N	9,67

Der Ansatz wurde mehrfach wiederholt unter Variation des Lösungsmittels, der zugesetzten Base und der Temperatur, trotzdem konnte keine bessere Ausbeute erzielt werden. Auch die Kupplung über die DCCI - Methode brachte kein zufriedenstellendes Ergebnis.

Di-Phthalyl-Cystindiamid

4,8 g Cystindiamid x 2 HBr (12 mMol) werden unter leichtem Erwärmen in 100 ml DMF gelöst und mit 3,4 ml TÄÄ neutrali-

siert. Nach 10 min werden 6 g Phthalsäureanhydrid (40 mmol) zugesetzt und der Ansatz über Nacht bei 35 - 40° C gerührt. Anschließend filtriert man das ausgefallene Salz ab, versetzt die DMF - Lösung mit viel Äther, saugt ab und nimmt zur Entfernung des nicht umgesetzten Cystindiamids oder asymmetrischer Produkte dreimal in 5 %iger Zitronensäure auf, wäscht mit H₂O neutral und trocknet über P₂O₅. Zur weiteren Reinigung kristallisiert man aus MeOH um.

Ausbeute: 4 g (62%)

Fp: 174° C

DC: I,III einheitlich

C₂₂H₂₂O₈N₄S₂ (534,6)

[α]_D²⁴ = - 255,5 (c=1; DMF)

Di-Phthalyl-(o-Methylester)-Cystindiamid

1 g der freien Säure wird in 100 ml MeOH suspensiert und bis zu konstanter Gelbfärbung mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt; während der Reaktion tritt Lösung ein. Zur Entfernung des überschüssigen Diazomethans rührt man über Nacht bei Raumtemperatur, rotiert die Reaktionslösung ein und wäscht mehrfach mit EE aus. Zur Entfernung nicht umgesetzter Säure rührt man das Reaktionsprodukt zweimal mit 10 ml 5 %iger NaHCO₃ - Lösung, wäscht mit Wasser neutral und kristallisiert aus MeOH/Äther um.

Ausbeute: 700 mg (70%) Fp: 188-90° C

DC: I,II,III einheitlich bis auf leichten Disulfidfleck.

C₁₂H₁₄N₂O₄S (282,3)

SH - Gehalt: 89 %

Phthalyl-(o-Methylester)-S-Methyl-Cysteinamid

1 g Di-Phthalyl-Cys-Diamid wird mit Mercaptoäthanol redu-

ziert, mit Äther ausgefällt, in MeOH suspensiert und solange mit ätherischer Diazomethanolösung versetzt bis die Gelbfärbung bestehen bleibt. Während der Reduktion tritt vollständige Lösung ein. Das Reaktionsprodukt beginnt nach 40 min auszufallen; zur vollständigen Ausfällung wird noch Äther zugesetzt.

Nach Absaugen und Trocknen wird aus MeOH umkristallisiert.

Ausbeute: 900 mg (86%)

Fp: 205 - 06° C

DC: I,II,III einheitlich

$C_{13}H_{16}N_2O_4S$ (296,3)

Z-Asp-CysNH₂ - Disulfid

4 g Cystindiamid x 2 HBr (10 mMol) werden in 100 ml DMF gelöst, mit 2,8 ml TAA versetzt und solange auf 40° C erhitzt bis alles ausgefallene Cystindiamid wieder gelöst ist. Anschließend tropft man 7,5 g Z-Asp-Anhydrid (30 mMol), das zuvor in 50 ml THF gelöst wurde, zu.

Man läßt den Reaktionsansatz unter ständigem leichtem Erwärmen über Nacht rühren, kühlt ab und trennt vom ausgefallenen Salz und füllt mit Äther.

Zur Entfernung des überschüssigen Z-Asp-Anhydrid bzw Z-Asp rührt man das Produkt mehrmals mit 200 ml EE bei 60° C.

Nach Abfiltrieren versetzt man den Niederschlag zweimal mit je 100 ml 5 %iger Zitronensäure, um nicht umgesetztes Cystindiamid zu entfernen, danach wird mit Wasser neutral gewaschen und getrocknet. Zur weiteren Reinigung kristallisiert man aus MeOH um.

Ausbeute: 5,0 g (68%)

Fp: 199° C

$[\alpha]_D^{24} = -95,8$ (c=1; DMF)

DC: I,II,III einheitlich

$C_{30}H_{36}N_6O_{12}S_2$ (736,8)

ber. C 48,90 H 4,89 N 11,41

gef. C 48,68 H 4,65 N 11,42

Z-Asp-CysNH₂

Reduktion des Disulfids:

1 g Disulfid wird in 5 ml DMF gelöst und mit 10 ml Mercapto-
toäthanol versetzt. Man rührt das Reaktionsgemisch 3 Stun-
den bei 35° C und über Nacht bei Raumtemperatur.

Die reduzierte Verbindung wird mit Äther ausgefällt und
zweimal aus MeOH/Äther umkristallisiert.

Wegen der schlechten Löslichkeit des Disulfids in Mercapto-
äthanol ist das Reduktionsergebnis ohne Zusatz von DMF
nicht zufriedenstellend.

Ausbeute: 700 g (70%) Fp: 161 - 62° C

DC: I, II, III einheitlich, aber vom Disulfid chromatographisch
nicht zu unterscheiden.

C₁₅H₁₉N₃O₆S (369,4)

SH - Gehalt nach zweimaliger Reduktion: 90%

Z-Asp(BOMe)-CysNH₂ - Disulfid

Die Suspension von 2 g Z-Asp-CysNH₂ - Disulfid in MeOH
wird solange mit einer ätherischen Diazomethanolösung
versetzt, bis die Gelbfärbung bestehen bleibt. Während
der Reaktion tritt keine vollständige Lösung ein; das
schwerlösliche Ausgangsprodukt geht über eine gallertige
Zwischenphase in das in MeOH wieder schwerlösliche Endpro-
dukt über. Nach Einengen und Absaugen wird zur Entfernung
der nicht veresterten Säure mehrfach mit 5 %iger NaHCO₃ -
Lösung gewaschen. Nach Neutralwaschen mit Wasser und Trock-
nen wird mehrfach mit EE ausgekocht.

Ausbeute: 1,6 g (78%) Fp: 152° C

DC: I, II, III einheitlich

C₃₂H₄₀N₆O₁₂S₂ (764,9)

[α]_D²⁴ = - 100,3 (c=1; DMF)

ber.	C	50,26	H	5,23	N	10,99
gef.	C	50,17	H	5,13	N	10,91

Z-Asp(BOMe)-CysNH₂

Reduktion des Disulfids:

1 g Disulfid werden mit 15 ml Mercaptoäthanol versetzt und 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Verlauf der Reaktion bildet sich eine Gallerte, nach Zugabe von 200 ml Äther und längerem Rühren im Eisbad fällt das Produkt als faseriger weißer Niederschlag aus. Nach dem Absaugen wäscht man solange mit Äther nach, bis kein Mercaptoäthanolgeruch mehr feststellbar ist. Zur weiteren Reinigung kristallisiert man aus MeOH um.

Ausbeute: 800 mg (80%) Fp: 184 - 85° C

DC: I,II,III einheitlich

C₁₆H₂₁N₃O₆S (383,5)

SH - Gehalt: 92%

Z-Asp(BOBzl)-CysNH₂ - Disulfid

4 g Cystindiamid x 2 HBr (10 mMol) und 7,1g Z-Asp(BOBzl) werden zusammen mit 3,0 g HOBT in 100 ml DMF gelöst, auf -10°C abgekühlt, mit 2,8 ml TAA und 4,5 g DCCI versetzt. Die Aufarbeitung erfolgt wie üblich. Zur Reinigung wird mehrfach mit EE ausgekocht.

Ausbeute: 5,6 g (63%) Fp: 159° C

DC: I,II,IV einheitlich

[α]_D²⁴ = 100,0 (c=1; DMF)

C₄₄H₄₈O₁₂N₆S₂ (917,0)

ber.	C	57,63	H	5,28	N	9,17
gef.	C	57,16	H	4,97	N	9,16

Z-Asp(BOBz)-CysNH₂

Reduktion des Disulfids:

1 g Disulfid wird unter Erwärmen auf 40° C zwei Stunden mit 10 ml Mercaptoäthanol versetzt,; nach Ausfällen mit Äther kristallisiert man zweimal aus MeOH/Äther um.

Ausbeute: 900 mg (90%) Fp: 154 - 58° C

DC: I,II,IV einheitlich

C₂₂H₂₅O₆N₃S (458,5)

SH - Gehalt: 94 %

Z-Glu(αOMe)γ-CysNH₂ - Disulfid

4 g Cystindiamid x 2 HBr (10 mMol) und 8,9 g Z-Glu(αOMe) werden in 100 ml DMF gelöst, auf - 10° C abgekühlt, mit 3 g HOBT (22 mMol), 2,8 ml TAA, 4,5 g DCCI versetzt und über Nacht gerührt. Nach Absaugen des DC - Harnstoffs wird das Filtrat in Wasser gegossen und das Reaktionsprodukt mit viel EE aus der H₂O - Phase extrahiert. Zur Entfernung überschüssiger Ausgangsprodukte und des asymmetrischen Cystinsubstitutionsprodukt wird nacheinander mit 5 %iger NaHCO₃, 5 %iger Zitronensäure ausgeschüttelt und mit Wasser neutral gewaschen. Das Reaktionsprodukt wird mit PE aus der Lösung gefällt und zur weiteren Reinigung aus MeOH/Äther umkristallisiert.

Ausbeut: 5,5 g (70%) Fp: 209 - 11° C

[α]_D²⁴ = -82,9 (c=1; DMF)

DC: I,II,III,IV einheitlich

C₃₄H₄₄N₆O₁₂S₂ (792,9)

ber. 51,50 H 5,59 N 10,60

gef. 51,06 H 5,55 N 10,50

Z-Glu(γ OMe)- α -CysNH₂ -Disulfid

Der Reaktionsansatz wird analog zu dem der isomeren Verbindung durchgeführt. Die Umsetzung verläuft mit gleicher Ausbeute.

Ausbeute: 5,6 g (71%) Fp: 187°C

DC: I, III, IV einheitlich

$[\alpha]_D^{24} = -106,3$ (c=1; DMF)

C₃₄H₄₄N₆O₁₂S₂ (792,9)

ber. C 51,50 H 5,59 N 10,60

gef. C 51,40 H 5,52 N 10,53

Z-Glu(α OMe)-CysNH₂

Reduktion des Disulfids:

1 g Disulfid wird in 10 ml Mercaptoäthanol 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wird durch Zugabe von 100 ml Äther gefällt, abgesaugt und mit Äther nachgewaschen. Zum Umkristallisieren wird das Produkt unter Zusatz von einigen Tropfen MeOH in EE gelöst und langsam mit PE gefällt. Da die SH - Verbindung als Gallerte anfällt ist mehrfaches Umkristallisieren notwendig.

Ausbeute: 850 mg (85%) Fp: 192 °C

DC: I, II, III, IV einheitlich

C₁₇H₂₃N₃O₆S (397,5)

SH - Gehalt: 90%

Z-Glu(γ OMe)-CysNH₂

Die isomere Verbindung wird analog behandelt; da sie aber erhebliche Löslichkeitsunterschiede aufweist, wird sie in

15 ml Mercaptoäthanol gelöst. Die entstehende Verbindung fällt während der Reaktion aus. Zur Reinigung wird aus MeOH/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 730 mg (73%) Fp: 195°C

DC: I,II,IV einheitlich

$C_{17}H_{23}N_3O_6S$ (397,6)

SH - Gehalt: 89%

Z-Asp-Gly-CysNH₂ - Disulfid

1 g Z-Asp(OBut)-Gly-CysNH₂ - Disulfid wird mit 10 ml TFA übergossen und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 20 Minuten wird das Reaktionsprodukt zur Trockne einrotiert. Beim Überschreiten der Reaktionszeit tritt ein leichter Ninhydrin positiver Schatten im Chromatogramm auf. Der trockne Rückstand wird mit Äther solange nachgewaschen bis kein TFA - Geruch mehr feststellbar ist.

Zur weiteren Reinigung wird aus MeOH/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 600 mg (70%) Fp: 196-99°C

$[\alpha]_D^{24} = -98,0$ (c=1; DMF)

Chromatogramm: I,II,III einheitlich

$C_{34}H_{42}N_8O_{14}S_2$ (850,9)

ber.	C	47,98	H	4,98	N	13,17
gef.	C	47,83	H	4,92	N	12,98

Z-Asp-Gly-CysNH₂

Reduktion des Disulfids:

1 g der freien Säure wird mit 10 ml Mercaptoäthanol versetzt. Nach 2 stündigem Rühren bei 50°C ist alles gelöst, zur Vervollständigung der Reaktion läßt man den Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Das Reaktionsprodukt fällt man

mit Äther aus und wäscht solange nach bis kein Mercaptoäthanol-Geruch mehr feststellbar ist. Anschließend kristallisiert man aus MeOH/Äther um.

Ausbeute: fast quantitativ

Fp: 165-67°C

DC: I,IV einheitlich in III auch nach mehrfachem Umkristallisieren leichter Schatten (vermutlich Disulfid)

$C_{17}H_{22}N_4O_7S$ (426,5)

SH - Gehalt: 92 %

Z-Glu-Gly-CysNH₂ - Disulfid

Die Abspaltung des tert. Butylesters erfolgte analog zu der Umsetzung des Asp - haltigen Peptids mit TFA. Die Reaktion verlief mit gleicher Ausbeute.

$[\alpha]_D^{24} = - 91,7$ (c=1, DMF)

Fp: 181-85°C

DC: I,II,III einheitlich

$C_{36}H_{46}N_8O_{14}S_2$ (878,9)

ber.	C	49,19	H	5,28	N	12,75
gef.	C	48,53	H	4,93	N	12,37

Z-Glu-Gly-CysNH₂

Die Reduktion des Disulfids erfolgte ebenfalls analog der Reduktion des Asp - haltigen Dipeptids. Der Ansatz muß allerdings eine Stunde unter Rückfluß gekocht werden, um vollständige Reaktion zu erreichen.

DC: I,II,III einheitlich bis auf leichten Disulfidschatten

Fp: 174-76°C.

$C_{18}H_{24}N_4O_7S$ (440,5)

SH - Gehalt: nach mehrfacher Reduktion 94 %

VI Zusammenfassung

1) Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die durch kooperative Katalyse beschleunigte Esterhydrolyse, die ein mögliches Modell für die enzymatische Ester- und Amidhydrolyse darstellt. Als katalytisch aktive Gruppen werden die auch in Enzymen wirksamen SH-, Imidazol- und Carboxylgruppen sowohl bei intra- als auch bei intermolekularer Katalyse der Esterhydrolyse untersucht. Kooperation dieser funktionellen Gruppen bei der Katalyse der Esterhydrolyse wird durch Verbindungen verwirklicht, die eine ideale Nachbarschaft der potentiell katalytisch aktiven Gruppen ermöglichen.

2) Zum Studium der intermolekular katalysierten Esterhydrolyse wurden die folgenden Peptidderivate synthetisiert, die mit den Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Cystein verschiedene Kombinationen der katalytisch aktiven Gruppen in verschiedenen Positionen (Abständen) enthalten:

- a) Z-Asp-CysNH₂
- b) Z-Asp-Gly-CysNH₂
- c) Z-Glu-Gly-CysNH₂
- d) Z-His-Ala-Gly-Gly-CysNH₂
- e) Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂
- f) Z-His-Ala-Asp-GlyOCH₃

Das Hauptproblem bei der Synthese dieser Peptide, die alle mehr als eine trifunktionelle Aminosäure enthalten, war die Wahl des günstigsten SH - Schutzes des Cysteins. Für die Synthese der cysteinhaltigen Peptide erwies sich die Verwendung von Cystin als besonders vorteilhaft. Bei der Synthese der Peptide e) und f) wurde eine Kupplung des Tripeptiddisulfids (Asp-Gly-CysNH₂)₂ bzw des Dipeptids Asp-GlyOCH₃ mit Z-His-AlaN₃ bei freier β -Carboxylgruppe durchgeführt. Austausch von Asparaginsäure in Verbindung e) und f) gegen Glutaminsäure führten zu Schwierigkeiten bei der Synthese, so daß es in diesen Fällen günstiger

erscheint γ -geschützte Derivate der Glutaminsäure zu verwenden.

3) Zur Untersuchung der intermolekular katalysierten Esterhydrolyse wurden folgende Verbindungen synthetisiert:

g) N-(o-Carbomethoxybenzoyl)-o-Aminothiophenol

h) N-(o-Carbomethoxybenzoyl)-Cysteinamid

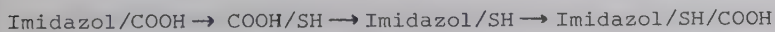
i) Z-Asp(BOR)-CysNH₂

k) Z-Glu(α OR)- γ -CysNH₂ R = Me bzw Bzl

l) Z-Glu(γ OR)- α -CysNH₂

Die Synthesen bereiteten keine besondere Schwierigkeiten. Wegen der schlechten Löslichkeit der Benzylester in wässriger Lösung konnten für die kinetischen Untersuchungen der Esterhydrolyse nur die Methylester verwendet werden. Die Synthese der Verbindungen m) o-Mercaptomethylbenzoesäuremethylester und n) 8-Mercapto-1-Naphthoesäure gelang nicht, da durch 'ideale Nachbarschaft' der funktionellen Gruppen unter allen untersuchten Bedingungen sofort Ringschluß zu den entsprechenden Thioestern erfolgt.

4) Für die Untersuchungen der katalytischen Aktivität der Peptidderivate wurden p-Nitrophenylacetat und Boc-Ala-Nitrophenylacetat als Substrate verwendet, da für beide Ester kinetische Daten der enzymatischen Hydrolyse vorliegen, und damit ein Vergleich der Effektivität der Modelle mit der von Enzymen möglich ist. Die Kinetik der katalysierten Esterhydrolyse läßt sich in keinem Fall durch eine einfache Brönsted-Gleichung beschreiben, oder anders ausgedrückt, die Esterhydrolyse wird stärker beschleunigt als es auf Grund der Basizität der am stärksten nukleophilen SH - Gruppe zu erwarten ist. Führt man diese Erhöhung der nukleophilen Reaktivität der primär katalytisch aktiven SH - Gruppe auf Nachbargruppeneffekt zurück, so ergibt sich für die Abstufung dieser Effekte folgende Reihe:



Für die untersuchten Reaktionen wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen und die räumliche Zuordnung der funktionellen

Gruppen an Kalottenmodellen der Verbindungen überprüft. Für die Effektivität der Katalyse sind Nachbargruppeneffekte und Vororientierung der Reaktionspartner von ausschlaggebender Bedeutung.

5) Die durch die Peptidderivate 7 - 12 katalysierte Hydrolyse von Boc-AlaONp verlief um den Faktor 10 schneller als die Katalyse der NPA - Hydrolyse. Die höhere Hydrolyserate ist auf die durch eine stärkere Polarisierung bedingte größere Labilität des Esters und eine durch die Struktur begünstigte Vororientierung der Reaktanten bedingt.

6) Im Unterschied zur intermolekular nukleophil katalysierten Hydrolyse von NPA und Boc-AlaONp ist die intramolekulare Katalyse der Esterhydrolyse in den Verbindungen g - l eine allgemeine Basenkatalyse. Die Effektivität der Katalyse wird auch in diesen Fällen durch den Grad der optimalen Annäherung und Fixierung der miteinander reagierenden Gruppen bestimmt. Zunehmende Flexibilität, die die Wahrscheinlichkeit einer idealen Annäherung vermindert, führt zu einem starken Abfall der Hydrolysegeschwindigkeiten.

7) Die aus der Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten berechneten thermodynamischen Parameter der verschiedenen Esterhydrolysen geben weitere Hinweise auf die bei der Katalyse wirksamen Mechanismen, die in der Änderung der Aktivierungsenthalpie und -entropie zum Ausdruck kommen.

8) Ein Vergleich der Effektivität der durch die synthetisierten Modellverbindungen bewirkte Katalyse mit der enzymatischen Umsetzung auf der Grundlage der k_2 bzw k_{cat} - Werte ergibt folgendes Bild: Die Effektivität der durch Papain, Ficin und Streptococci - Protease katalysierte Boc-Ala-ONp - Hydrolyse liegt um den Faktor 10 - 30 unter der durch die wirksamste Modellverbindung Z-His-Ala-Asp-Gly-CysNH₂ katalysierten Esterhydrolyse, während der Vergleich mit Chymotrypsin zeigt, daß das aktivste Enzymmodell ein Viertel der Enzymaktivität bei der NPA - Spaltung besitzt.

VII. Literaturverzeichnis

- [1] Chemical Reaktivty and Biological Role of Funktional Groups in Enzymes; Biochemical Society Symposium Nr. 31 (Ed. R.M.S. Smellie), Academic Press, London 1970
- [2] J.R.Whiteaker,
J.Amer. Chem. Soc. 84, 1900-04 (1962)
- [3] J.W. Olgilvie, J.T. Tildon und B.S. Strauch,
Biochemistry 3, 754-58 (1964)
- [4] E. Katschalski, G.D. Fasman und E. Simons,
Arch.Biochem. Biophys. 88, 361-65 (1960)
- [5] G.A. Rogers und T.C. Bruice,
J. Amer. Chem. Soc. 96, 2463-72 (1974)
- [6] F. Schneider,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 1034-42 (1967)
- [7] F. Schneider,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 1525-28 (1968)
- [8] T. Komai und J. Nogucki,
Biochem. J. 70, 467-76 (1971)
- [9] G.A. Rogers und T.C. Bruice,
J. Amer. Chem. Soc. 96, 2473-81 (1974)
- [10] A.J. Kirby und A.R. Fersht, Intramolekular Catalysis in Progress in Bioorganic Chemistry Vol I (1971)
- [11] T.Y.Liu, W.H. Stein, S. Moore und S.D. Elliott,
J. biol. Chem. 240, 1143-49 (1965)
- [12] E.P. Whitehead und B.R. Rabin,
Biochem. J. 90, 532-39 (1964)
- [13] B.R. Rabin und D.C. Watts,
Nature (London) 188, 1163-65 (1960)
- [14] J.A. Thoma und D.E. Koshland jr.,
J. Mol. Biol. 2, 169-70 (1960)

- [15] K. Wallenfels und O.P. Malhotra,
The Enzymes; Vol IV 409-30, Second Ed., (Ed. P.
Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck), Academic Press 1960
- [16] M.R. Hollaway, A.P. Mathias und B.R. Rubin,
Biochem. Biophys. Acta 92, 111-24 (1964)
- [17] T. Inagami und T. Murachi,
Biochemistry 2, 1439- (1963)
- [18] E.L. Smith,
J. Biol. Chem. 233, 1392-97 (1958)
- [19] G. Lowe und A. Williams,
Biochem. J. 96, 189-204 (1965)
- [20] H. G. Löffler,
Dissertation, Universität Marburg 1974
- [21] F.D. Chattaway,
J. Chem. Soc. 1931, 2495-96
- [22] E.A. Guggenheim,
Phil. Mag. 2, 538-43 (1926)
- [23] I. Photaki, V. Bardakos, A.W. Lake und G. Lowe,
J. Chem. Soc. (c) 1968, 1860-64
- [24] R.E. Benesh und R. Benesh,
J. Amer. Chem. Soc. 77, 5877-81 (1955)
- [25] K. Wallenfels und Chr. Steffer,
Biochem. Z. 346, 119-32 (1966)
- [26] H. Lindley,
Biochem. J. 74, 577-84 (1960)
- [27] H. Lindley,
Biochem. J. 82, 418-25 (1962)
- [28] G.L. Ellmann,
Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77 (1959)
- [29] W.P. Jencks Catalysis in Chemistry and Enzymology
Mc Graw-Hill Series in Advanced Chemistry 61969)
S.562 ff

- [30] loc. cit. [29] 605-11
- [31] L. Michaelis und M.L. Menten,
Biochem. Z. 49, 333 (1913)
T.E. Barmann,
Enzyme Handbook Vol 1 6-9 (1969)
- [32] D.S. Tarbell und D.P. Cameron,
J. Amer. Chem Soc. 78, 2731 (1956)
- [33] B.M. Anderson, E.H. Cordes und W.P. Jencks,
J. Biol. Chem. 236, 455 (1961)
- [34] H. Lachmann,
Diplomarbeit, Tübingen 1970
- [35] loc. cit [29]
- [36] A.F. Hegarty und T.C. Bruice
J. Amer. Chem Soc. 92, 6575-88 (1970)
- [37] T.C. Bruice und St. J. Benkovic,
Bioorganic Mechanism I New York 27, 46 (1966)
W. Benjamin, Inc.
- [38] loc. cit. [29] S. 67
- [39] H.J. Goren und M. Fridkin,
Eur. J. Biochem. 41, 263-72 (1974)
- [40] H. Lachmann, H. Mauser, F. Schneider und H. Wenck,
Z. Naturforsch. 26b, 629-38 (1971)
- [41] Reinhard von Kleinsorgen,
Diplomarbeit , Marburg 1974
- [42] W.P. Jencks und J. Carriuolo,
J. Amer. Chem. Soc. 82, 1778-86 (1960)
- [43] T. C. Bruice und G.L. Schmir,
J. Amer.Chem. Soc. 79, 1663-67 (1957)
- [44] M.L. Bender und B.W. Turnquest,
J. Amer. Chem. Soc. 79, 1652-55 (1957)

- [45] W.P. Jencks,
J. Amer. Chem. Soc. 80, 4581-85 (1958)
- [46] V. Rossbach, F. Schneider und H. Wenck,
Z. Naturforsch. 11, 1144-51 (1971)
- [47] F. Schneider und H. Wenck,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 1221-24 (1967)
- [48] R. v. Kleinsorgen, H.G. Löffler und F. Schneider,
Chimia 29, 385-88 (1975)
- [49] J. Schmidt, W.U. Ahmad und F. Turba,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 345, 91-99 (1966)
- [50] M. Schachner,
Diplomarbeit, Tübingen 1968
- [51] G. R. Schonbaum und M.L. Bender,
J. Amer. Chem. Soc. 82, 1900-04 (1960)
- [52] M. Fridkin und H.J. Goren,
Eur. J. Biochem. 41, 273-83 (1974)
- [53] T.C. Bruice und J.J. Bruice,
J. Amer. Chem. Soc. 84, 2128-33 (1962)
- [54] F.H. Westheimer und M.L. Bender,
J. Amer. Chem. Soc. 84, 4908-09 (1962)
- [55] J. Schoenleber und M.P. Lochon,
Comptes rendus 278 C, 1235-38, 1293-96, 1381-84 (1974)
- [56] M.T. Behme und E.H. Cordes,
J. Org. Chem. 29, 1255-57 (1964)
- [57] J.A. Shafer und H. Morawetz,
J. Org. Chem. 28, 1899-1901 (1963)
- [58] P.E. Zimmering, E.W. Westhead jr. und H. Morawetz,
Biochim. Biophys. Acta 25, 376-81 (1957)
- [59] F. Schneider, E. Schaich und H. Wenck,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 349, 1525-28 (1968)
- [60] G.A. Rogers und T.C. Bruice,
J. Amer. Chem. Soc. 96, 2473-81 (1974)

- [61] J.C. Sheehan, G.B. Benett und J.A. Schneider,
J. Amer. Chem. Soc. 88, 3455-56 (1966)
- [62] A. Kapoor, N. Azeza, N.H. Somaiya und M.A. Trimboli,
J. Pharm. Science 60, 956-7 (1971)
- [63] T.Y. Liu, N. Nomura, E.K. Jonsson und B. G. Wallace,
J. Biol. Chem. 244, 20 5745-56 (1969)
- [64] A. Kortt und T.Y. Liu,
Biochemistry 12, 2 328-45 (1973)
- [65] F. Schneider und H. Wenck,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 350, 1653-61 (1961)
- [66] S.A. Bernhard, A. Berger, J.H. Carter, E. Katchalski,
M. Sela und Y. Shalitin,
J. Amer. Chem. Soc. 84, 2421-34 (1961)
- [67] Y. Shalitin und S.A. Bernhard,
J. Amer. Chem. Soc. 86, 2291-92 (1964)
- [68] K.E. Neet und D.E. Koshland jr.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 1606-11 (1966)
- [69] K.E. Neet, A. Nanci und D.E. Koshland jr.,
J. Biol. Chem. 243, 6392-6401 (1968)
- [70] L. Polgar und M.L. Bender,
Biochemistry 6, 610-20 (1967)
- [71] L. Polgar und M.L. Bender
Biochemistry 8, 136-40 (1969)
- [72] K. Kuromizu und J. Meienhofer,
J. Amer. Chem. Soc. 96, 4978-81 (1974)
- [73] K. Kuromizu und J. Meienhofer,
Tetrahedron 37, 3259-62 (1974)
- [74] M. Bergmann und L. Zervas,
Chem. Ber. 65, 1192-1201 (1932)
- [75] G. W. Anderson und Mc Gregor,
J. Amer. Chem. Soc. 79, 6180-83 (1957)

- [76] K. König und R. Geiger,
Chem. Ber. 103, 788-98 (1970)
- [77] T. Curtius,
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 35, 3226-28 (1902)
- [78] J. Honzl und J. Rudinger,
Coll. Czech. Chem Commun. 26, 2333 (1961)
- [79] D.S. Kemp, S.W. Wang, G. Busby III und G. Hugel,
J. Amer. Chem Soc. 92, 1043-55 (1970)
- [80] W.J. le Quesne und G.T. Young,
J. Chem. Soc. 1950, 1959-63
- [81] W.J. le Quesne und G.T. Young,
J. Chem. Soc. 1952, 24-28
- [82] J.C. Anderson, G.W. Kenner, J.K. McLeod und R.C.
Sheppard,
Tetrahedron Suppl. 8, 39-51 (1966)
- [83] R.G. Strachan, W.J. Paleveda jr, R.F. Nutt, R.A. Vitali
D.F. Veber, M.J. Dichinson, V. Garsky, J.E. Deak, E.
Walton, S.R. Jenkins, F. W. Holly und R. Hirschmann,
J. Amer. Chem. Soc. 91, 503-05 (1969)
- [84] S.R. Jenkins, R.F. Nutt, R.S. Dewey, D.F. Veber, F.W.
Holly, W.J. Paleveda jr., R.G. Strachan, E.F. Schönewaldt,
H. Barkemeyer, M.J. Dichinson, J. Sondly, R. Hirsch-
mann und E. Walton,
J. Amer. Chem. Soc. 91, 505-06 (1969)
- [85] B. Riniker und R. Schwyzer,
Helv. Chim. Acta 47, 2357-74 (1964)
- [86] F. Weygand, A. Prox und W. König,
Chem. Ber. 99, 1451-60 (1966)
- [87] G. W. Anderson, J.E. Zimmermann und F. M. Callahan,
J. Amer. Chem. Soc. 88, 1338-39 (1966)
- [88] P. Sieber und B. Riniker,
Peptides 1971, North-Holland Ed. Comp. Amsterdam 1973
49-53.

- [89] R. Schwyzer, B. Iselin, H. Kappeler, B. Riniker, W. Rittel und H. Zuber,
Helv. Chim. Acta 46, 1975-96 (1963)
- [90] W.W. Cleland,
Biochemistry 3, 480-82 (1964)
- [91] A. Schöberl und H. Gräffe,
Liebigs Ann. Chem. 614, 66-83 (1958)
- [92] E. Wünsch,
in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie
4. Auflage (Herausgeber E. Müller), Thieme Verlag,
Stuttgart; Band 15, Teil 1 (1974) 677-80
- [93] V. Du Vigneaud, C. Kessler, J.M. Swann, C.W. Roberts,
P.G. Katsoyannis und S. Gordon,
J. Amer. Chem. Soc. 75, 4879-80 (1953)
- [94] C.R. Harington und T.H. Mead,
Biochem. J. 29, 1602 (1935)
- [95] H. Zahn,
Tetrahedron 50, 5095-98 (1967)
H. Zahn und G. Schmid,
Liebigs Ann. Chem. 731, 91-112 (1970)
- [96] T. Curtius,
J. pr. Chem. 70, 57-108 (1904)
T. Curtius und H. Curtius,
J. pr. Chem. 70, 158-94 (1904)
- [97] V. Prelog und P. Wieland,
Helv. Chim. Acta 29, 1128-32 (1946)
- [98] M. Brenner und Ch. Burckhardt,
Helv. Chim. Acta 34, 1070-83 (1951)
- [99] R.B. Merrifield und D.W. Woolley,
J. Amer. Chem. Soc. 78, 4646-49 (1956)
- [100] K.L. Agarwal, G.W. Kenner und R.G. Sheppard,
J. Chem. Soc. (c) 1968, 1384-91

- [101] A.R. Battersby und J.C. Robinsonn,
J. Chem. Soc 1955, 259-69
- [102] J. Kovacs, K. Medzihradzsky und V. Bruckner,
Naturwiss. 41, 450 (1954)
- [103] E. Wünsch und A. Zwick,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 333, 108-13 (1963)
- [104] W. König und R. Geiger,
Chem. Ber. 106, 3626-35 (1973)
- [105] J.H. Gardner und C.A. Naylor jr.,
Organic Syntheses 16, 71-72 (1936)
- [106] M. Bremer, A. Niederwieser und G. Pataki,
in E. Stahl: Dünnschichtchromatographie, Springer
Verlag Heidelberg (1962)
- [107] F. Reindel und W. Hoppe,
Chem. Ber. 87, 1103-07 (1954)
- [108] G. Pataki,
J. Chromatogr. 12, 541 (1963)
- [109] H. Pauly,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 42, 517 (1904)

H. Pauly und A. Binz,
Z. Farben und Textilind. 3, 373 (1904)
- [110] K. Randerrath,
Dünnschichtchromatographie 114-32, Verlag Chemie,
Weinheim (1965)
- [111] Organikum, Org. Chem. Grundpraktikum
7. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften
Berlin, 1967, 615-649.
- [112] IUPAG - IUB Commission on Biochemical Nomenclatur
J. Biol. Chem. 241, 2491-95 (1966)
- [113] IUPAG - IUB Commission on Biochemical Nomenclatur,
J. Biol. Chem. 247, 977-83 (1972)
- [114] IUPAG - IUB Commission on Biochemical Nomenclatur,
Biochem. 14, 449-62 (1975)

- [115] H. Zahn und H. Schüssler,
Liebigs Ann. Chem. 641, 176-83 (1961)
- [116] M. Goodman und K.C. Stueben,
J. Amer. Chem. Soc. 81, 3980-83 (1959)
- [117] K. Hofmann, R. Schmiechen, R.D. Wells Y. Wolman und
N. Yanaihara,
J. Amer. Chem. Soc. 87, 611-19 (1965)
- [118] V. Herrmann,
Diplomarbeit Marburg 1973
- [119] W.J. le Quesne und G.T. Young,
J. Chem. Soc. 1950, 1954-63
- [120] E. Wünsch und A. Zwick,
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 328, 235-40 (1962)
- [121] L. Benoiton,
Can. J. Chem. 40, 570-72 (1962)
- [122] J. Wiley und Sons,
Biochem. Prepar. 2, 75 (1952)
- [123] Y. Hirotsu, T. Shiba und T. Kaneko,
Bull. Chem. Soc. Jap. 43,2, 1564-67 (1970)
- [124] S. Goldschmidt und C. Jutz,
Chem. Ber. 86, 1116-21 (1953)
- [125] E. Klieger und H. Gibian,
Liebigs Ann. Chem. 640, 145-56 (1961)
- [126] S. Guttmann und R.A. Boissonnas,
Helv. Chim. Acta. 41, 1852-67 (1958)
- [127] W.E. Hanby, S.G. Walley J. Watson und E.J. Ambrose,
J. Chem. Soc. 1950, 3239-48
- [128] E. Schröder,
Liebigs Ann. Chem. 692, 241-45 (1966)
- [129] J.P. Greenstein und M. Winitz,
Chemistry of the Amino Acid Vol. 3 (1961), 2671-72

- [130] R.W.Holley und E. Sonheimer,
J. Amer. Chem. Soc. 76, 1326-28 (1954)
- [131] R. Nietzki und E. Braunschweig,
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27, 3381-84 (1894)
- [132] E. Müller und G. Zimmermann,
J. prakt. Chem. 111, 277-92 (1925)
- [133] A. Bassler,
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 16, 2714-20 (1883)
- [134] A.G. Eckstrand,
J. prakt. Chem. 38, 139-85 (1889)
- [135] M.E.E. Pisovschi,
Bull. Soc. Chim. 9, 86-90 (1911)
- [136] Elsevier,
Encyclopaedia of Org. Chemistry, Series III, Vol 12B
Amsterdam 1954, 4201-06
- [137] A.G. Eckstrand,
J. prakt. Chem. 38, 241-49 (1889)
- [138] A. Behr und W.A. van Dorp;
Liebigs Ann. Chem. u. Pharm. 172, 263-78 (1874)
- [139] R. Wohlfahrt,
J. prakt. Chem. 66, 5551-5557 (1909)
- [140] M. Claasz,
Chem. Ber. 45, 1015-32 (1912)
- [141] H. Meyer,
Monatsh. f. Chem. 22, 577-586 (1901)
- [142] loc. cit. [111] S. 512

Lebenslauf

Am 12. August 1947 wurde ich in Düsseldorf als Tochter des Herbert Fisch und seiner Ehefrau Frieda Fisch geb. Ersfeld geboren.

Von 1954-58 besuchte ich die Volksschule in Krefeld, von 1958-62 das Ricarda Huch Lyceum in Krefeld und nach Umzug meiner Eltern nach Bad Dürkheim/Rheinland-Pfalz das neusprachliche Gymnasium in Bad Dürkheim und legte dort im Oktober 1966 die Reifeprüfung ab.

Im Oktober 1966 begann ich mit dem Chemiestudium an der Philipps Universität Marburg, legte im September 1968 das Vordiplom ab und im Dezember 1970 das Diplomhauptexamen.

Von März 1971 bis Dezember 1971 arbeitete ich im Physiologisch-Chemischen Institut II der Philipps - Universität in Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Fr. Schneider an meiner Diplomarbeit mit dem Thema: DNS-, RNS- und Proteinsynthese von Ehrlich - Acites - Tumorzellen unter verschiedenen Bedingungen der Energieversorgung.

Im März 1972 begann ich mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation, die ich im Juli 1975 abschließen konnte.

Von März 1971 bis April 1973 war ich als wiss. Hilfskraft angestellt und ab Juli 1973 bin ich als wiss. Bedienstete am Physiologisch-Chemischen Institut II tätig.

